

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-508420

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)9月21日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/02	Z N A H	9282-4 B	
A 6 1 K 38/22			
C 0 7 H 21/04	B	8615-4 C	
		9281-4 B	C 1 2 N 15/ 00
		7729-4 B	5/ 00
			A
			B
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-503790
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)5月17日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)11月18日
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 3 / 0 4 6 4 8
 (87) 国際公開番号 W O 9 3 / 2 3 5 4 1
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)11月25日
 (31) 優先権主張番号 8 8 4, 8 1 1
 (32) 優先日 1992年5月18日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号, 8 8 5, 9 7 1
 (32) 優先日 1992年5月18日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

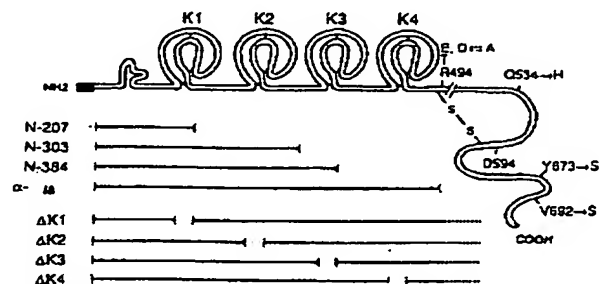
(71) 出願人 ジェネンテック、インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア94080、サ
 ウス・サン・フランシスコ、ポイント・サ
 ン・ブルーノ・ブルバード460番
 (72) 発明者 ゴドウスキ、ポール・ジェイ
 アメリカ合衆国カリフォルニア94044、パ
 シフィカ、ロマ・ヴィスタ・テラス305番
 (72) 発明者 ロッカー、ナサリー・エイ
 アメリカ合衆国カリフォルニア94121、サ
 ン・フランシスコ、フォーティース・アベ
 ニュー741番
 (74) 代理人 弁理士 青山 稔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝細胞成長因子変異体

(57) 【要約】

本発明は肝細胞成長因子 (HGF) アミノ酸配列変異体に関するものである。好ましい変異体は、HGFをその二本鎖型にインビボで変換することのできる酵素による蛋白分解的開裂に対し耐性であり、そして/またはHGFのプロテアーゼドメイン内に突然変異を含む。



請求の範囲

1. HGFをインビデでその二本鎖型に変換することのできる酵素による蛋白分解的開裂に対し耐性である、肝細胞成長因子(HGF)変異体。
2. ヒトHGF(huHGF)の変異体である、請求項1に記載の変異体。
3. HGFをその二本鎖型に変換することのできる酵素により認識される領域内の位置指定突然変異誘発によって一本鎖型に安定化された、肝細胞成長因子(HGF)変異体。
4. HGFレセプターを結合させることのできる、請求項3に記載の変異体。
5. ヒトHGF(huHGF)の変異体である、請求項4に記載の変異体。
6. 野生型huHGFアミノ酸配列のアミノ酸493、494、495または496位に、またはこれらと隣接してアミノ酸変換を有する、請求項5に記載の変異体。
7. 該変換が置換である、請求項6に記載の変異体。
8. 該変換が挿入または除去である、請求項8に記載の変異体。
9. アミノ酸494位がアルギニン以外のアミノ酸により占められている、請求項6に記載の変異体。
10. 該アミノ酸がグルタミン酸、アスパラギン酸およびアラニンより成る群から選ばれる、請求項9に記載の変異体。
11. 該変換が野生型HGFアミノ酸配列のアミノ酸493-496における少なくとも1個のアミノ酸の置換である、請求項6に記載の変異体。
12. 野生型huHGFのアミノ酸494位のアルギニンが別のアミノ酸に置換されている、請求項11に記載の変異体。
13. 野生型huHGFのアミノ酸495位のバリンが別のアミノ酸に置換されている、請求項11に記載の変異体。
14. 野生型huHGFのアミノ酸496位のバリンが別のアミノ酸に置換されている、請求項11に記載の変異体。
15. 野生型huHGFの实质上完全なレセプター結合親和性を保持している、請求項6に記載の変異体。

32. 野生型huHGFアミノ酸配列の534位のグルタミンがヒスチジンに置換されている、請求項31に記載の変異体。
33. 野生型huHGFアミノ酸配列の692位のバリンがセリンに置換されている、請求項31に記載の変異体。
34. さらに、野生型huHGFアミノ酸配列の534位のグルタミンがヒスチジンに置換されている、請求項33に記載の変異体。
35. HGFのプロチアーゼドメイン内の部位にアミノ酸変換を有し、且つ対応する野生型HGFの实质上完全なレセプター結合親和性を保持している、請求項1-15のいずれかに記載の変異体。
36. 蛋白分解的開裂に対し耐性である、請求項16-34のいずれかに記載の変異体。
37. 実質上HGFレセプターの活性化ができない、請求項1-36のいずれかに記載の変異体。
38. 実質上HGF肝細胞成長刺激性を欠く、請求項1-36のいずれかに記載の変異体。
39. 野生型huHGFと比較して増大したレセプター結合親和性を有する、請求項1-36のいずれかに記載の変異体。
40. レセプター結合親和性の増大が、huHGFアミノ酸配列のレセプター結合ドメインにおける変換により達成される、請求項39に記載の変異体。
41. 該変換がhuHGF α 鎖にある、請求項40に記載の変異体。
42. 該変換がクリングル1ドメイン内にある、請求項41に記載の変異体。
43. 該変換が野生型huHGFアミノ酸配列のアミノ酸159、161、195および197位により定義される部分の内部にある、請求項42に記載の変異体。
44. 該変換が野生型huHGFのアミノ酸173位にある、請求項42に記載の変異体。
45. 該変換が野生型huHGFのヘアピンドメイン内、ヘアピンドメインのN末端、またはヘアピンおよびクリングル1ドメインの間にある、請求項41に記載の変異体。

16. HGFのプロチアーゼドメイン内の部位にアミノ酸変換を有し、且つ対応する野生型HGFの实质上完全なレセプター結合親和性を保持している、肝細胞成長因子(HGF)変異体。
17. セリンプロチアーゼの活性部位に対応する領域に変換を含む、請求項16に記載の変異体。
18. 野生型ヒトHGF(huHGF)アミノ酸配列の534、673および692位のいずれかに、またはそれらと隣接して変換を含む、請求項16に記載の変異体。
19. 該変換が置換である、請求項18に記載の変異体。
20. 野生型huHGFアミノ酸配列の534位のグルタミンが別のアミノ酸に置換されている、請求項19に記載の変異体。
21. 該アミノ酸がヒスチジンである、請求項20に記載の変異体。
22. 野生型huHGFアミノ酸配列の673位のチロシンが別のアミノ酸に置換されている、請求項19に記載の変異体。
23. 該アミノ酸が芳香族およびヘテロ環基を欠く、請求項22に記載の変異体。
24. 該アミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、システイン、グリシン、アラニン、およびバリンから選ばれる、請求項23に記載の変異体。
25. 該アミノ酸がセリンである、請求項24に記載の変異体。
26. 野生型huHGFアミノ酸配列の692位のバリンが別のアミノ酸に置換されている、請求項19に記載の変異体。
27. 該アミノ酸が酸性である、請求項26に記載の変異体。
28. 該アミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギンおよびグルタミンから選ばれる、請求項27に記載の変異体。
29. 該アミノ酸がセリンである、請求項28に記載の変異体。
30. 野生型huHGFアミノ酸配列の534位のグルタミンまたは692位のバリンの置換をさらに含む、請求項24に記載の変異体。
31. 野生型huHGFアミノ酸配列の673位のチロシンがセリンに置換されている、請求項30に記載の変異体。

46. 機能的クリングル2ドメインを欠く、請求項1-45のいずれかに記載の変異体。
47. 機能的クリングル3ドメインを欠く、請求項1-45のいずれかに記載の変異体。
48. 機能的クリングル4ドメインを欠く、請求項1-45のいずれかに記載の変異体。
49. 請求項1-48のいずれかに記載の変異体をコードしているヌクレオチド配列。
50. 請求項49に記載のヌクレオチド配列を含み、且つこれを適当な宿主細胞中で発現することのできる、複製可能な発現ベクター。
51. 請求項50に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
52. HGF変異体をコードしている核酸を発現するよう請求項51に記載の宿主細胞を培養することからなる方法。
53. 宿主細胞培養から該変異体を回収することをもさらに含む、請求項52に記載の方法。
54. そのレセプターに対する野生型huHGFの結合を競合的に阻害し得る量の請求項1-48のいずれかに記載の変異体を高容量許容し得る担体と混合したる薬用組成物。
55. 必要な患者に請求項54に記載の組成物を投与することからなる、huHGFレセプターの活性化に付随する病理学的状態を処置する方法。

肝細胞成長因子受容体

発明の要旨

1. 発明の分野

本発明は、肝細胞成長因子 (HGF) のアミノ酸配列受容体、係る受容体を製造する方法および手段、ならびにそれらを含む医薬組成物に関するものである。

1.1. 背景および関連技術の説明

HGFは最初、肝細胞に対する分裂促進因子として同定された [マイクロボロス等、Cancer Res., 44巻4414-4419頁 (1984); ラッセル等、J. Cell. Physiol., 119巻183-192頁 (1984) およびナカムラ等、Biochem. Biophys. Res. Commun., 122巻1450-1459頁 (1984)]。ナカムラ等、上記、は、肝臓を部分的に切除したラットの血清からのHGFの精製を報告した。その後HGFはラットの血小板から精製され、そのサブユニット構造が決定された [ナカムラ等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83巻6489-6493頁 (1986); およびナカムラ等、FEBS Letters, 224巻311-316頁 (1987)]。ヒト血清からのヒトHGF (hHGF) の精製は、ゴード等、J. Clin. Invest., 81巻414-419頁 (1988) により最初に記載された。

ラットHGFおよびhHGFは共に分子クローニングされており、「デルタ5 HGF」と呼ばれる5個のアミノ酸を欠失する天然に存在する受容体のクローニングおよび配列決定もされている [ミヤザワ等、Biochem. Biophys. Res. Commun., 163巻967-973頁 (1989); ナカムラ等、Nature, 342巻440-443頁 (1989); セキ等、Biochem. and Biophys. Res. Commun., 172巻321-327頁 (1990); タシロ等、Proc. Natl. Acad. Sci.

のままである。HGFは4個の糖鎖グリコシル化部位を含んでおり、これらは α 鎖の294および402位ならびに β 鎖の566および653位に位置している。

ヒト血清から分離されたcDNAの一部に、15塩基対のフレーム内欠失が観察された。このcDNA配列をCOS-1細胞中で一過性発現させると、クリングル1ドメインに5個のアミノ酸を欠く、コードされているHGF分子 (デルタ5 HGF) は完全に機能的であることが判明した (セキ等、上記)。

成熟hHGFのN末端フィンガーおよび最初の2個のクリングルドメインに対するコード化配列を含むhHGF転写物の、別のサブタイズされた型に相当する、天然に存在するhHGF受容体が、近年同定された [チャン等、Science, 254巻1382-1385頁 (1991); ミヤザワ等、Eur. J. Biochem., 197巻15-22頁 (1991)]。HGF/NK2と呼ばれるこの受容体は、成熟HGFの糖鎖的アンタゴニストであると提唱された。

ラットHGFのアミノ酸配列とhHGFのそれとの比較は、二つの配列が高度に保存され、且つ同じ性質の構造的特徴を持っていることを明らかにした。ラットHGF中の4つのクリングルドメインの長さはhHGFと全く同じである。さらに、システイン残基が全く同じ位置にあり、これは類似の三次元構造であることを示唆している (オカジマ等、上記; タシロ等、上記)。

HGFレセプターは、c-Metプロトオンコジンの産物 [ボッターロ等、Science, 251巻802-804頁 (1991); ナルディーニ等、Oncogene, 6巻501-504頁 (1991)]、190kDaヘテロ二量体 (ジスルフィド結合した50kDaの α 鎖および145kDaの β 鎖) の重鎖チロシンキナーゼ [パーク等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84巻6379-6383頁 (1987)] であると同定されている。このc-Met蛋白は、HGF結合部位の145kDa β サブユニットのチロシン残基上でホスホリル化される。

HGFのレベルは、肝不全の重症の血漿中 (ゴード等、上記) および実験的に肝の損傷を誘発した動物の血漿 [リンドロー等、Hepatology, 13巻73

USA, 87巻3200-3204頁 (1990); オカジマ等、Eur. J. Biochem., 193巻375-381頁 (1990)]。

ヒトの血清から精製された主要な型に相当するhHGFの成熟型は、ヒトのプロホルモンのアミノ酸R494およびV495の間の蛋白分解的断片により誘導されるジスルフィド結合したヘテロ二量体である。この断片断片は、4407ミノ酸の α サブユニット (M.69kDa) および2347ミノ酸の β サブユニット (M.34kDa) から成る分子を生成する。hHGF cDNAのヌクレオチド配列は、 α および β 鎖がいずれもブレブリン受容体とコードしている単一オープンリーディングフレーム中にあることを明らかにした。成熟hHGFの予想された一次構造において、 α 鎖のCys487および β 鎖のCys604の間に環状5-5結合が形成されている (ナカムラ等、Nature, 上記、を参照されたい)。メチオニン基で始まる54のアミノ酸が α 鎖のN末端に先行する。このセグメントは、特徴ある31残基の疎水性リーダー (シグナル) 配列およびプロセッシングを含む。 α 鎖はアミノ酸 (aa) 55で始まり、4個のクリングルドメインを含んでいる。いわゆる「ヘアピンドメイン」は、野生型ヒトHGFのアミノ酸残基70-96を含んでいる。クリングル1ドメインはおよそaa128からおよそaa206まで及んでおり、クリングル2ドメインはおよそaa211およびおよそ288の間にあり、クリングル3ドメインはおよそaa303からおよそaa383まで及んでいると定義され、そしてクリングル4ドメインは α 鎖のおよそaa391からおよそaa464まで及んでいる。種々のクリングルドメインの定義は胎の蛋白 (プロトロンビン、プラスミノーゲン) のクリングルドメインとの相関性に基づくものであり、したがって上記の断片は近似的なものに過ぎない。今までの所、これらのクリングルの構造は決定されていない。hHGFの β 鎖はセリンプロテアーゼの触媒ドメインと高い相関性を示す (プラスミノーゲンセリンプロテアーゼドメインに対し38%の相関性)。しかしながら、セリンプロテアーゼの触媒三残基を形成する3個の残基のうち2個はhHGFにおいて保存されていない。故に、そのセリンプロテアーゼ様ドメインにも拘らず、hHGFには蛋白分解活性が低いようであり、また β 鎖の正確な役割は未知

4-750頁 (1991)) または血清 [アサミ等、J. Biochem., 109巻8-13頁 (1991)] 中で上昇する。この応答の速度は速く、肝の再生の間のDNA合成の第一週に先行し、これはHGFがこの工程の開始に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。より最近になって、HGFが、メラノサイト、脳細胞、ケラチン生成細胞、或る種の内皮細胞および上皮由来の細胞を含む様々な型の細胞に対する分裂促進因子であることが示された [マツモト等、Biochem. Biophys. Res. Commun., 176巻、45-51頁 (1991); イダ等、Biochem. Biophys. Res. Commun., 174巻、831-838頁 (1991); ハン等、Biochem., 30巻9768-9780 (1991); ルビン等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88巻415-419頁 (1991)]。興味深いことに、HGFは、インビトロで上皮および血管内皮細胞の増殖を促進する活性である「数因子」としても作用することができる [ストーカー等、Nature, 327巻239-242頁 (1987); ワイダー等、J. Cell Biol., 111巻2097-2108頁 (1990); ナルディーニ等、EMBO J., 10巻2867-2878頁 (1991)]。その上、最近HGFは上皮のモルフォゲンとして記載された [モンテサーノ等、Cell, 67巻901-908頁 (1991)]。故に、HGFは、腫瘍の増殖および肝の再生において重要であると仮定された。最近にわたるc-Met/HGFレセプターの活性化が、ある種の悪性腫瘍に観察された [ターバー等、EMBO J., 5巻2623頁 (1986); ショルゲル等、Nature, 339巻155頁 (1988)]。

HGFアミノ酸配列中の機能的に重要なドメインを同定するために、HGFの構造-活性関係をより詳細に理解することが望まれる。

HGFとそのレセプターとの相互作用を司るアミノ酸残基を同定することが特に望ましいであろう。

HGFの生物活性を司るアミノ酸残基を同定することもまた望ましいであろう。対応する成熟野生型HGFと比較して変化した (好ましくは増強された) レセ

プター結合親和性を有するHGFのアミノ酸配列変異体を提供することがさらに望ましいであろう。

対応する野生型HGFと比較してレセプター結合親和性は保持または増強されているがHGFの生物活性が実質上無い、HGFのアミノ酸配列変異体を提供することもまた望ましいであろう。このような分子はHGF作用の競合的アンタゴニストとして作用し得る。

対応する野生型HGFと比較してレセプター結合親和性が保持または増強されており且つ生物活性が増強されているHGFのアミノ酸配列変異体を提供することはさらに望ましいであろう(HGFアゴニスト)。したがって、対応する成熟野生型HGFのレセプター結合親和性が保持または改善されているHGF変異体を提供することが本発明の一つの目的である。対応する成熟野生型HGFの実質上完全なレセプター結合親和性を保持し、且つHGFレセプター活性化が実質上できないHGF変異体を提供することが本発明の別の目的である。対応する成熟野生型HGFの実質上完全なレセプター結合親和性を保持し、且つ生物学的性質が改善されたHGF変異体を提供することがさらに別の目的である。

これらのおよびさらなる目的は当業者にとって明らかであろう。

発明の要旨

本発明の目的は、野生型HGFアミノ酸配列の様々なドメイン内部にアミノ酸変換を有する、HGF変異体の供給によって達成される。

一つの態様において、HGFをインビトロで二本鎖型に変換することのできる酵素による蛋白分解的変換に耐性であるHGF変異体を提供される。この変異体は、好ましくは、HGFを二本鎖型に変換することのできる酵素により認識される領域内での位置指定突然変異誘発によって、一本鎖型で安定化される。

或る態様において、このような変異体は、野生型huHGFアミノ酸配列のアミノ酸493、494、495または496位にまたはこれと隣接してアミノ酸変換を有する。この変換は好ましくは野生型huHGFアミノ酸配列のアミノ酸493-496位における少なくとも一つのアミノ酸の置換である。

別の態様において、この変異体は、対応する野生型HGFの実質上完全なレセ

プター結合親和性を保持し、且つ実質上HGFレセプター活性化ができない。増強されたレセプター結合親和性を有するHGFレセプターを活性化する能力を欠くHGF変異体が特に好ましい。このような化合物は対応する野生型HGFの競合的アンタゴニストであり、そして、十分な濃度で存在する時、野生型HGFがそれらのリガンドに結合するのを阻害することができる。

別の態様において、HGFのプロテアーゼドメイン内の部位にアミノ酸変換を有し、対応する野生型HGFのレセプター結合親和性を実質上完全に保持しているHGF変異体を提供される。

或る特定の態様において、これらの変異体は、対応する野生型HGFと比較して実質上保持されたまたは改善されたレセプター結合親和性を有し、HGFの生物活性を実質上欠いている。このような化合物は、十分な濃度で存在するならば、HGF作用の競合的アンタゴニストとして作用するであろう。

別の特定の態様において、この変異体は、対応する野生型HGFと比較して、実質上保持されたまたは改善されたレセプター結合親和性を改善された生物活性と結び付ける。このような変異体は、HGFアゴニストとして価値がある。

好ましい態様において、この変異体のHGF変異体は、セリンプロテアーゼの触媒部位に対応する領域に変換を含む。より好ましくは、この変換は、野生型ヒトHGF(huHGF)アミノ酸配列の534、673および692位のいずれかにあるか、またはこれらのいずれかに隣接している。

この変換は好ましくは置換である。

特に好ましい態様において、野生型huHGF配列のアミノ酸534、673および692位の残基のうち少なくとも2個が別のアミノ酸によって置換されている。

本発明に係るHGF変異体の好ましい群においては、huHGF配列の673位のチロシン(Y)および692位のバリン(V)の両者が別のアミノ酸によって置換されている。この変換は、野生型huHGFのレセプター結合親和性は実質上保持するがHGFの生物活性を実質上欠いているHGF変異体を生成するかも知れない。

一本鎖から二本鎖への開環部位の周りにおよびプロテアーゼドメイン内での突然変異を有利に結び付けて、改善された生物学的性質が得られるかも知れない。

対応する野生型HGFと比較して増強したレセプター結合親和性を有する変異体が特に好ましい。レセプター結合親和性の増大は、例えば野生型HGFアミノ酸配列のレセプター結合ドメインにおける、そして好ましくはクリングル1ドメイン内部における変換によって達成され得る。

野生型huHGFアミノ酸配列のアミノ酸159、161、195および197位、またはアミノ酸173位により定義される部分内にアミノ酸変換を有するクリングル1変異体が特に好ましいが、クリングル1ドメイン内の他の位置もまたHGFのレセプター結合親和性および/または特異活性に純粋な影響を及ぼすものと同定されている。

さらに、クリングル1ドメインに先行するアミノ酸位置、特にヘパインドメインに対するNまたはC末端ちょうどに変換を有するアミノ酸配列変異体は、対応する野生型HGFと有意に異なる結合性および生物活性を有することが見いだされている。

本発明に係る変異体は、機能的クリングル2および/またはクリングル3および/またはクリングル4ドメインを欠いてよい。

全ての態様においてhuHGFアミノ酸配列変異体が好ましい。

別の態様において、本発明は、上記の変異体をコードしているDNA配列、保るDNA配列を含み且つ形質転換された宿主細胞中でこれらを実現することのできる複製可能な発現ベクター、形質転換された宿主細胞、および、該HGF変異体をコードしているDNAを発現させるよう、宿主細胞を培養することからなる方法に関するものである。

さらに別の態様において、本発明は、HGFアゴニストまたはアンタゴニスト特性を有するHGF変異体を含む治療用組成物に関するものである。

図面の簡単な説明

図1は、huHGFの α および β サブユニットの概略図である。 α 鎖には、アミノ酸1-31を含むシグナル配列(図まれている領域)、予想されたフィンガ

ーおよびそれぞれ3個のジスルフィド結合を有する4個のクリングルドメインが示されている。huHGFのヘテロ二量体 α/β 型の生成のための開環部位は、P1開環残基R494のすぐ後に設けられている。この最後の残基は特異的にE、DまたはAのいずれかに置換されてHGF一本鎖変異体を生成した。この開環部位に近く β 鎖はセリンプロテアーゼとの相同性を有する。 α および β 鎖はC487(α)およびC607(β)の間の唯一のジスルフィド結合により結合している(ナカムラ等、1989、上記)。 β 鎖内部の3個の残基は個々にまたは組み合わせて置換され、セリンプロテアーゼの真正な残基を再構成した。C末端切除変異体の成熟型の図式を下に示す: N-207、第一のクリングルの後で除去; N-303、第二のクリングルの後で除去; N-384、第三のクリングルおよび α 鎖の後で除去。各クリングルの除去($\Delta K1$ 、 $\Delta K2$ 、 $\Delta K3$ および $\Delta K4$)が導入された変異体もまた示す。各々の場合において、除去はクリングル全体をC1からC6へと特異的に除く。

図2は、野生型rhuHGFおよび一本鎖変異体のウェスタンブロットの結果を示している。野生型rhuHGF(WT)または変異体R494E、R494AまたはR494Dのいずれかを発現する安定な293細胞または恒久的にトランスフェクトさせた293細胞から得られた条件培地を、8%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル上で還元条件下に分離しブロッティングした。このブロットを、主に α 鎖でエピトープを認識するポリクローナル抗HGF抗血清と反応させた。マーカーの分子量(キログルトン)は示されている通りである。さらに、huHGFの α 鎖および非開環一本鎖型の位置を示す。このポリクローナル抗体は、検出される量のhuHGFを発現しない、対照によりトランスフェクトされた293細胞にさえ存在する未反応バンド(*)と交差反応することに留意されたい。

図3: 野生型(WT) rhuHGFおよび一本鎖変異体の分裂促進活性(A)および競合的レセプター結合(B)。(A)実験例2に記載されるように、WT rhuHGFおよび変異体が一次培養中のラット肝細胞のDNA合成を誘導する能力によって、生物活性を測定した。代償的検定における二つの測定値の平均

c p mを示す。対照細胞からの増殖の上昇はこれらの細胞においてDNA合成を阻害しなかった（バックグラウンドレベルより高いc p mの増加が無い）。(B) 融合的結合を行なうため、w i r h u H G Fまたは抗体を含むヒト293細胞の上昇の様々な特徴を、実施例2に記載のように、h u H G Fレセプター-I g G融合蛋白50 p mと共にインキュベートした。データは、代表的実験からの融合しているリガンドのパーセンテージとして結合の阻害を表わし、対照293細胞からのバックグラウンド値を差し引くことにより補正した。

図4: 野生型r h u H G F、一本鎖またはプロテアーゼドメインh u H G F抗体による、H G Fレセプターの145 k D a β サブユニット上のリガンド誘導チロシンホスホリ化のウェスタンブロット。精製されたw i r h u H G F (W T)、一本鎖(R494E)または二重プロテアーゼ抗体(Y673S、V692S)200 n g / m lを加えずに(-)または加えて5分間インキュベートしたA549細胞からの抽出液を調製し、抗H G Fレセプター抗体で免疫沈降させ、抗ホスチロシン抗体でブロッティングした。分子量(キログルトン)は記載の通りである。

図5は、プラスミドp R K 5、1をコードしているヌクレオチド配列を示す(配列番号1)。

図6は、プラスミドp、C I S、E B O Nをコードしているヌクレオチド配列を示す(配列番号15)。

発明の詳細な説明

1. 定義

本明細書中使用される「肝細胞成長因子」、「H G F」および「h u H G F」という語は、野生型(ヒト)H G Fのレセプターに特異的に結合することのできる(ヒト)成長因子を意味し、この成長因子は典型的には6個のドメイン(フィンガー、クリングル1、クリングル2、クリングル3、クリングル4およびセリンプロテアーゼドメイン)を持つ構造を有するが、にも拘らず、これが質的なH G Fレセプター結合性を維持するならば、より少ないドメインを有していてもよく、またはそのドメインのうち幾つかが反復されていてもよい。この定義は特

に、セキ等、上記、により提示されるアルタ3 h u H G Fを包含する。「肝細胞成長因子」および「H G F」という語はさらに、任意のヒト以外の動物由来の肝細胞成長因子、とりわけラットH G Fを包含する。

「野生型ヒト肝細胞成長因子」、「天然ヒト肝細胞成長因子」、「野生型h u H G F」、および「天然h u H G F」という語は、天然配列のヒトH G F、即ち、天然供給源から精製された、化学合成された、または組み換えにより生成された、その成熟型、プレ型、プレプロ型、およびプロ型を包含する、ミヤザワ等、1989、上記、またはナカムラ等、1989、上記により公表されているc D N A配列によりコードされている、天然配列ヒトH G Fを指す。ミヤザワ等およびナカムラ等により報告されている配列は14のアミノ酸において異なっている。この相違の理由は全て明らかである訳ではない。多量性またはタロニングによる産物が可能性の中に入っている。どちらの配列も、本発明の目的のために定義された前記の語によって特に包含されている。各配列のアミノ酸配列における1またはそれ以上のアミノ酸の相違により変えられる、天然の対立遺伝子変異が存在し、且つこれらが個体間起こることということが理解されるであろう。本明細書中の変異体h u H G F分子におけるアミノ酸の位置は、ミヤザワ等、1989、上記、の番号付けに従って示される。

「(H G F)生物活性」、「生物学的活性」、「活性」および「活性である」という語は、野生型ヒトH G Fにより示される何らかの分裂促進、モトジェニクまたは形態形成活性を意味する。H G Fの生物活性は、例えば肝細胞成長促進のインビトロまたはインビボ検定で測定することができる。一次培養におけるラット肝細胞の肝細胞は、肝細胞の増殖を調節する因子の探求に広く使用されている。したがって、H G F変異体の分裂促進作用は、H G F分子が一次培養におけるラット肝細胞のD N A合成を誘導する能力を試験するために好適な検定、例えば実施例2に記載されるような検定において簡便に測定することができる。ヒトの肝細胞は、移植に容認できないと考えられる臓器上の全肝腫瘍、子供の移植に用いられる成人の肝臓から切り取った部分、胎児の肝臓および他の適応の外科手術の際に抽出された肝臓の残部から取得することもできる。ヒト肝細胞は、正常なラッ

ト肝細胞の一次培養を調製するために確立された方法と同様にして培養することができる。肝細胞のD N A合成は、例えば反復合成のための適当なヒドロキシ尿素対照を用いた³HチミジンのD N Aへの取り込みを測定することにより検定することができる。

肝細胞の増殖に及ぼすH G F変異体の効果は、肝臓の機能不全および再生の動物モデル、例えば部分的肝切除、または四塩化炭素に起因する肝の損傷後のラット、D-ガラクトサミン誘発急性肝不全モデル等において、インビボで試験することもできる。適切なプロトコルに従って、肝臓、例えばα-ナフチルイソチオシアナート(A N I T)を、再現できる有意な肝臓の酵素およびビリルビンレベルの上昇をもたらすことのできる、前もって定められた量で、ラットに投与する。次いでこのラットを、試験されるべきH G F変異体で処理し、屠殺し、肝臓の酵素およびビリルビンのレベルを測定する。この肝臓はさらに、肝の損傷についても観察する。

本明細書中使用される「野生型(h u)H G Fの實質上完全なレセプター結合親和性を保持」という表現およびその文法的な変形は、そのH G F変異体のレセプター結合親和性が、野生型(h u)H G Fがその天然のレセプターを結合させる親和性の約70%より低くない、好ましくは約80%より低くない、より好ましくは約95%より低くないことを意味する。

「H G Fレセプター活性化が實質上できない」および「H G F生物活性を實質上欠く」という語は、H G F変異体により表わされる活性が、上記定義による確立されたレセプター活性化またはH G F生物活性の検定において、野生型(ヒト)H G Fの各活性の約20%より低い、好ましくは約15%より低い、より好ましくは約10%より低い、最も好ましくは約5%より低いことを意味する。

「アミノ酸」および「アミノ酸類」という語は、全ての天然に存在するL-α-アミノ酸を指す。この定義はノルロイシン、オルニチン、およびホモシステインの包含を意味する。アミノ酸は一字または三文字表記のいずれかによって指定される:

A s p D アスパラギン酸 I l e I イソロイシン

T h r T スレオニン	L e u L ロイシン
S e r S セリン	T y r Y チロシン
G l u E グルタミン酸	P h e F フェニルアラニン
P r o P プロリン	H i s H ヒスチジン
G l y G グリシン	L y s K リジン
A l a A アラニン	A r g R アルギニン
C y s C システイン	T r p W トリプトファン
V a l V バリン	G l n Q グルタミン
M e t M メチオニン	A s n N アスパラギン

これらのアミノ酸は、それらの側鎖の化学的組成および性質に従って分類することができる。これらは大きく二つの群、荷電および非荷電に分類される。これらの群の各々は、アミノ酸をより正確に分類するため、さらに分けられる:

1. 荷電アミノ酸

酸性側基: アスパラギン酸、グルタミン酸

塩基性側基: リジン、アルギニン、ヒスチジン

1.1. 非荷電アミノ酸

親水性側基: セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン

脂肪族側基: グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン

非脂性側基: システイン、メチオニン、プロリン

芳香族側基: フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン

「変換」、「アミノ酸変換」、「変異体」および「アミノ酸配列変異体」という語は、野生型(ヒト)H G Fと比較してそれらのアミノ酸配列に幾らかの相違を有するH G F分子を指す。通常の変異体は、それらの構造中に保持されている野生型(ヒト)H G FのF/インと少なくとも約80%の相同性を有するであろうが、好ましくははるF/インと少なくとも約90%かそれ以上であろう。

変換H G F変異体は、対応する野生型H G F配列中少なくとも1個のアミノ酸残基が除去され、代わりに同じ位置に異なるアミノ酸が挿入されているH G F変異体である。この変換は、分子中ただ1個のアミノ酸が置換されている単一で

あってよく、または、同じ分子中2個またはそれ以上のアミノ酸が置換されている置換であってもよい。

本発明のアミノ酸と電荷および/または構造が有意に異なる側鎖を有するアミノ酸に置換することによって、HGF分子の活性に実質的な変化が得られる。この型の置換は、ポリペプチドバックボーンの構造および/または置換の領域における当該分子の電荷もしくは疎水性に影響を及ぼすと予想される。

電荷および/または構造において天然分子と類似の側鎖を有するアミノ酸に置換することによって、HGF分子の活性の中等度の変化が予想されるであろう。同置換と呼ばれるこの型の置換は、ポリペプチドバックボーンの構造または置換の領域における当該分子の電荷もしくは疎水性のいずれをも実質上変化させないと予想される。

挿入HGF変異体は、野生型HGF分子中の特定の位置のアミノ酸と直接隣接して1またはそれ以上のアミノ酸が挿入されているHGF変異体である。アミノ酸に直接隣接して、とは、そのアミノ酸のα-カルボキシまたはα-アミノ官能基のいずれかに結合していることを意味する。この挿入は、1またはそれ以上のアミノ酸であってもよい。通常、挿入は1または2個の同種アミノ酸から成る。電荷および/または構造において挿入部位と隣接するアミノ酸に類似しているアミノ酸を同種と定義する。これとは別に本発明は、挿入部位に隣接するアミノ酸と実質上異なる電荷および/または構造を有するアミノ酸の挿入を包含する。

除去変異体は、野生型HGF分子中の1またはそれ以上のアミノ酸が除去されている変異体である。通常、除去変異体は、HGF分子の特定の領域において1または2個のアミノ酸が除去されているであろう。

本明細書全体に使用されるhuhGFアミノ酸配列変異体を表現するための表記法を下に記載する。huhGFのポリペプチド鎖中の特定のアミノ酸の位置を数字で指定する。この数字は、ミヤザワ等、1989、上記、に開示されるような成熟野生型ヒトHGFポリペプチドのアミノ酸配列中のアミノ酸位置を指す。本出願においては、huhGF変異体中の同様に位置する残基は、実際の残基番号が分子内での除去または挿入のためその番号でなくとも、このような番号によ

って表記する。これは、例えば、位置指定除去または挿入変異体において起こるであろう。アミノ酸は一文字コードを用いて指定する。置換されたアミノ酸は、そのアミノ酸のポリペプチド鎖中の位置を示す数字の左側に野生型アミノ酸を明示し、そしてこの数字の右側に置換された結果のアミノ酸を明示することによって表記する。

例えば、野生型huhGF分子のアミノ酸494位のアミノ酸アルギニン(R)をグルタミン酸(E)で置換すると、R494E huhGFと表記されるhuhGF変異体が生成する。同様に、野生型huhGF分子のアミノ酸673位のチロシン(Y)をセリン(S)に、そしてアミノ酸692位のバリン(V)をセリン(S)に置換することによって得られるhuhGF変異体は、Y673S、V692S huhGFと表記される。

除去変異体は、除去の各々の場合のアミノ酸残基および位置を全て書き明し、ギリシャ文字デルタ「Δ」を、示されたアミノ酸の左に位置させることによって明記される。1個のアミノ酸の除去は、Δを一文字コードおよび除去されたアミノ酸の位置を示す数字の左に位置させることによって示す。

挿入変異体は、挿入されたアミノ酸の周りに括弧「[]」を使用することにより表記し、挿入の位置は、その挿入の両側のアミノ酸の位置を示すことにより表記する。

本発明に係るHGF変異体のアミノ酸配列における変化は、野生型ヒトHGFアミノ酸配列中のアミノ酸位置に言及して示される。(ミヤザワ等、上記)。様々な理由から最も好ましいアミノ酸配列を定める方法は、当分野において良く知られている。

「をコードしているDNA配列」、「をコードしているDNA」および「をコードしている塩基」という語は、デオキシリボ核酸の鎖に付したデオキシリボヌクレオチドの順序または配列を意味する。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序はポリペプチド鎖に付したアミノ酸の順序を決定する。DNA配列はこのようにしてアミノ酸配列をコードしている。

「複製可能な複製ベクター」および「発現ベクター」という語は、一片の外來

DNAをその中に挿入させているかも知れない、通常二本鎖の、一片のDNAを意味する。外來DNAは、宿主細胞中に天然には見いだされないヘテロロガスなDNAとして定義される。このベクターは、外來またはヘテロロガスなDNAを適当な宿主細胞中に運搬するために使用される。いったん宿主細胞に入るとこのベクターは宿主の染色体DNAとは独立して複製することができ、このベクターおよびその挿入されている(外來)DNAのコピーが幾つか生成される。さらにこのベクターは、外來DNAをポリペプチドに翻訳させる必要な要素を含んでいる。このようにして、外來DNAによりコードされているポリペプチドの分子が多数、迅速に合成される。

本発明の文脈において、「細胞」、「セルライン」、および「細胞培養」という表現は互換的に用いられ、このような表現は全て子孫を包含する。

「形質転換された(宿主)細胞」、「形質転換体」および「形質転換された」という語は、細胞中へのDNAの導入を意味する。この細胞は「宿主細胞」と称する。導入されたDNAは通常、挿入されたDNAの断片を含むベクターの形をとっている。導入されるDNA配列は、宿主細胞と同じ種由来もしくは宿主細胞とは異なる種由来であってもよく、または幾らかの外來DNAおよび幾らかのホモロガスDNAを含むハイブリッドDNA配列であってもよい。形質転換体および形質転換された(宿主)細胞という語は、転移の回数に拘らず、当該一次細胞およびそれから導出される培養を包含する。全ての子孫は、故意のまたは偶然の突然変異のため、DNA含量が正確に等しい訳ではないこともまた理解されるであろう。初めに形質転換された細胞においてスクリーニングされたのと同じ遺伝子または生物学的性質を有する突然変異体子孫が包含される。

本明細書中使用される「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」という技術は一般に、1987年7月28日登録の米国特許第4683195号およびカレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology)、アウスベル等編、グリーン・パブリッシング・アソシエーツ・アンド・ウィレイ・インターサイエンス、1991、2巻15章に記載のように少量の複製、RNAおよび/

またはDNAの特定の断片を増幅する方法を指す。

本明細書中使用される「モノクローナル抗体」という語は、実質上均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、即ち、その集団を構成している個々の抗体は、少量存在するかも知れない、天然に存在する可能性のある突然変異を除いて同一である。したがって、修飾語句「モノクローナル」とは、別個の抗体の混合物ではない抗体の性格を示す。モノクローナル抗体は、抗セレクトリグランド抗体の可変(超可変を含む)ドメインと不変ドメインとのスプライシング(このうち1方だけがセレクトリグランドを指向する)(例えば「ヒト化」抗体)、または重鎖と軽鎖とのスプライシング、または取る種由来の鎖と別の種由来の鎖とのスプライシング、または、供給源の種または免疫グロブリンクラスもしくはサブクラスの特定に拘らず、ヘテロロガスな蛋白との融合、により生成されるハイブリッドおよび組み換え抗体、ならびに抗体フラグメント(例えばFab、F(ab')₂、およびFv)を包含する。キャピリー等、米国特許第4816567号;メイズおよびラモイ、モノクローナル・アンチボディ・プロダクション・テクニック・アンド・アプリケーションズ(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications)、79-97頁(マーセル・デッカー・Inc.、ニューヨーク、1987)。したがって修飾語句「モノクローナル」は、このような実質上等質な抗体集団から得られるような抗体の性格を示すものであって、何らかの特定の方法によってその抗体を産生することを必要としていないと解釈すべきではない。

「免疫グロブリン」という語は一般に、通常、共に天然の「Y」立体配置でシスチン結合している重鎖または軽鎖を含むポリペプチドを指すが、それらの四量体または二量体を包含するそれらの間の別の結合もまたその範囲内にある。

免疫グロブリン(Ig)およびそれらの取る変異体は既知であり、多数のものが組織培養中で製造されている。例えば、米国特許第4745055号;EP256634号;フォークナー等、Nature、298巻286頁(1982);EP120694号;EP125023号;モリソン、J. Immunol.、123巻793頁(1979);ケーラー等、Proc. Nat'l. Aca

ポリウム・オン・マクロモレキュラー・アンド・リコンビナント・DNA (Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA)、A. ウェルトン編、エルゼヴィア、アムステルダム (1981) に開示されるようなM13ファージのようなベクターを包含する。これらのファージは市販品を容易に入手でき、それらの用途は当業者には一般に良く知られている。これに代わって、一本鎖ファージ複製起点を含むプラスミドベクター (ヴェイラ等、Meth. Enzymol.、153巻3頁 (1987)) を使用して一本鎖DNAを得ることもできる。

オリゴヌクレオチドは、クラア等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA、75巻5765頁 (1978)) により記載されるような当分野で良く知られる技術を用いて容易に合成される。

実施例1のHGF変異体の製造に用いられる特異的突然変異誘発法は、クンケル等、Methods in Enzymol.、154巻367-382頁 (1987) によって記載された。

1以上のアミノ酸が置換されている突然変異体は幾つかの方法のうちの一つによって生成することができる。もしアミノ酸がポリペプチド鎖において接近しているならば、それらは、所望のアミノ酸置換全てをコードしている1個のオリゴヌクレオチドを用いて同時に突然変異させることができる。しかしながら、もしアミノ酸が互いに数からの距離をおいて位置しているならば (例えば10アミノ酸以上離れている)、所望の置換を全てコードしている単一のオリゴヌクレオチドを作り出すのはより困難である。代わりに、二つの代替法のうち一つを使用することができる。第一の方法では、置換すべきアミノ酸各々について別々のオリゴヌクレオチドを生成させる。次いでこのオリゴヌクレオチドを一本鎖型DNAに同時にアニリングし、そうすると鎖型から合成されるDNAの第二の鎖は所望のアミノ酸置換の全てをコードしているであろう。この代替法は、所望の突然変異体を製造するために2またはそれ以上の突然変異誘発の過程を含む。

野生型HGFまたは変異体分子をコードしているDNA配列に突然変異を作る、当分野で知られるもう一つの方法は、出発HGF分子をコードしているDNA配列を、制限酵素による消化によって適当な位置で開裂し、正しく複製したDNA

を回収し、所望アミノ酸配列および平滑端を有するポリリンカーのようなフランキング領域をコードしているオリゴヌクレオチドを合成し (または、ポリリンカーの代わりに、HGFコード化DNAの複製にも使用された制限酵素で合成オリゴヌクレオチドを消化し、それにより粘着端を作り出す)、そしてこの合成DNAをHGFコード化領域遺伝子の両側にライゲーションすることを含む。

PCR突然変異誘発もまた、例えば1987年7月28日登録の米国特許第4683195号およびカレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology)、アウスベル等、編、グラーン・パブリッシング・アソシエーツ・アンド・ウィレリー・インターサイエンス、2巻、15章、1991に記載のように、本発明に係るHGF変異体の製造に好適である。以下の考案はDNAに關するものであるが、この技術はRNAにも適用し得るということが理解されるであろう。PCR技術は一般に以下の方法を指す。PCRにおいて少量の鎖型DNAが出発物質として使用される時、鎖型DNA中の対応する領域と配列が互に異なるプライマーを使用して、そのプライマーが鎖型と相違する位置においてのみ鎖型配列と異なっている特異的DNAフラグメントを比較的大量に作り出すことができる。プラスミドDNAに突然変異を導入するためには、プライマーのうち1個は突然変異の位置と一重重複するように、且つその突然変異を含むように設計し、他のプライマーの配列はこのプラスミドの反対側の鎖の配列一つなりと同一でなければならないが、この配列は該プラスミドDNAのどこに位置していてもよい。しかしながら、第二のプライマーの配列は第一のプライマーの配列から200ヌクレオチド以内に位置し、その結果、最終的には、該プライマーを境界とするDNAの増幅された領域全体が容易に配列決定され得ることが好ましい。今述べたようなプライマー対を使用するPCR増幅は、プライマーにより特定される突然変異の位置で、そして鎖型のコピーは幾分限りが起こり得るため、ひょっとすると他の位置で異なっているDNAフラグメントの集団を生成する。生成物に対する鎖型の比率が極端に低いと、生成物DNAフラグメントの大部分は所望の突然変異を組込む。この生成物は、標準的DNA技術を用いて、PCR検出としての役割を有するプラスミド中の対応領域と置き換えるのに使用される。突

然変異体第二プライマーを使用するか、または異なった突然変異体プライマーによる第二のPCRを実施し、得られた二つのPCRフラグメントを同時に三 (またはそれ以上) 部分ライゲーションでベクターフラグメントにライゲーションすることにより、突然変異を別々の位置に同時に導入することができる。

本発明に係るHGF変異体をコードしているcDNAは、さらなるクローニングまたは発現のために、複製可能なベクター中に挿入される。

好適なベクターは標準的組み換えDNA法を用いて調製する。分離されたプラスミドおよびDNAフラグメントを開裂させ、置え、特定の順序でライゲーションして所望のベクターを作成する。

ライゲーションの後、ここで挿入された外来遺伝子を有するベクターを適当な宿主細胞中に導入する。形質転換された細胞を、抗生物質、通常は、ベクター上のtetおよび/またはamp耐性遺伝子の存在のためにそれらに対し耐性となったテトラサイクリン (tet) またはアンピシリン (amp) 上での増殖によって選択する。ライゲーション混合物が真核生物宿主細胞中に導入されたならば、形質転換された細胞はDHFR/MTX系により選択することができる。形質転換された細胞を培養中で増殖させ、次いでプラスミドDNA (プラスミドとは、目的の外来遺伝子にライゲーションされたベクターを指す) を分離する。次にこのプラスミドDNAを制限地図作成および/またはDNA配列決定により分析する。DNA配列決定は一般にノシング等、Nucleic Acids Res.、9巻309頁 (1981) の方法またはマクサム等、Methods of Enzymology、65巻499頁 (1980) の方法のいずれかによって実施する。

原核生物は、本発明の最初のクローニング工程のための好ましい宿主細胞である。これらは、大量のDNAの迅速な生産、位置指定突然変異誘発に用いられる一本鎖DNA鎖型の生成、多くの突然変異体の同時スクリーニング、および作り出された突然変異体のDNA配列決定のために特に有用である。本発明に係るHGF変異体を発現させるためには、真核生物宿主、例えば真核微生物 (酵母) および多細胞生物 (哺乳動物細胞培養) もまた使用することができる。本発明に係るHGF変異体の産生において使用するのに好適な原核生物、例えば大腸菌、真

核微生物および多細胞生物細胞培養、ならびに発現ベクターは、例えばWO90/02798号 (1990年5月22日公開) に開示されている。

クローニングおよび発現方法は当分野で良く知られており、例えば前記の公開されたPCT特許出願 (WO90/02798) に開示されている。

哺乳動物細胞が宿主細胞として使用される場合、トランスフェクションは一般に、グラハムおよびヴァン・デル・エブ、Virology、52巻546頁 (1978) に記載されるような燐酸カルシウム沈澱法によって実施する。しかしながら、微注入、電気穿孔、またはプロトプラスト融合といったようなDNAを細胞中に導入するその他の方法もまた好適に用いられる。

宿主として酵母を使用する場合、トランスフェクションは一般に、ヒネン、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、75巻1929-1933頁 (1978) に教示されるようにポリエチレンジリコールを用いて達成する。

実質的な細胞量構造を含む原核生物細胞を使用する場合、好ましいトランスフェクションの方法は、コーエン等、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)、69巻2110頁 (1972) に記載されるような、カルシウムを使用するカルシウム処理、または、より最近では電気穿孔である。

HGF変異体は好ましくは分泌蛋白として培養から回収されるが、分泌シグナル無しで直接発現される場合には宿主細胞培養液から回収することもできる。この変異体がヒト起源以外の組み換え細胞で発現される場合、その結果この変異体はヒト起源の蛋白を全く持たない。しかしながら、蛋白に関して実質上均質の調製物を得るためには、変異体を組み換え細胞蛋白から精製する必要がある。第一段階として、培養または格納液を濾過して細胞断片を除去する。

次に、高濃度のクロマトグラフィー法、例えばゲル濾過、イオン交換、疎水性相互作用、親和、免疫親和クロマトグラフィー、逆相HPLC; 沈澱、例えばエタノール沈澱、硫酸アンモニウム沈澱、または好ましくはセファロースに共有結合させた抗HGF (ポリクローナルまたはモノクローナル) 抗体による免疫沈澱の適当な組合せによって、変異体を、混在する可溶性蛋白から精製する。ヘパリンに対するその高い親和性の故に、HGFはヘパリン、例えばヘパリンセファロースカラム上で簡単に精製することができる。当業者には、天然HGFに通した

複製は、組み替え細胞培養において発現される際のHGFまたはその変異体の性質の変化を考慮した修飾を必要とするということが認識されるであろう。

上記のように、 huHGF は4つの特定のグリコシル化部位を含んでおり、それらは α 鎖の294および402位ならびに β 鎖の586および653位に位置している。これらの位置はラットHGFアミノ酸配列において保守されている。グリコシル化変異体は本発明の範囲内にある。

ポリペプチドのグリコシル化は典型的にはN-結合またはO-結合のいずれかである。N-結合とは、アスパラギン残基の側鎖に炭水化物基が結合していることを指す。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニン（ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖への炭水化物基の糖基結合に対する認識配列である。O-結合グリコシル化とは、糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうち一つがヒドロキシアミノ酸、最も普通にはセリンまたはスレオニンと結合していることを指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンもまたO-結合グリコシル化に含まれる。O-結合グリコシル化部位は、例えばHGF分子のアミノ酸配列に対し1またはそれ以上のセリンまたはスレオニン残基を付加または置換することにより、修飾することができる。容易にするために、変換は通常、アミノ酸配列変異体に関して上に述べた技術を実質的に使用して、DNAレベルで指す。

本発明に係るHGF変異体に対するグリコシドの化学的または酵素的結合を用いて炭水化物置換基の置換またはプロファイルを修飾または増加させることもできる。これらの方法は、O-結合（またはN-結合）グリコシル化の可能なポリペプチドの生成を必要としないという点で有利である。使用される結合様式に応じて、糖は、(a) アルギニンおよびヒスチジン、(b) 遊離カルボキシル基、(c) 遊離ヒドロキシ基、例えばシステインの遊離ヒドロキシ基、(d) 遊離スルフィド基、例えばセリン、スレオニン、またはヒドロキシプロリンの遊離スルフィド基、(e) 芳香族残基、例えばフェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンの芳香族残基、または(f) グルタミンのアミド基、に結合することができる。これらの方法は、WO87/05330（1987年9月11日公開）

族された個々の残基が、その修飾されたアミノ酸残基を含むペプチドフラグメントの分離によって同定される。このような修飾は当分野における通常の知識の範囲内にあり、過度の贅言をすることなく実施される。

二官能基による誘導体形成は、HGF変異体の分子内凝集体の製造、ならびに検定または診断用途への使用のためにHGF変異体を水不溶性支持体マトリックスまたは表面に吸着させるために有用である。さらに、細胞接着の研究は、コンホメーション構造についての直接的な情報を提供するであろう。一般的に使用される候補試薬は、1. 1-ビス（シアノアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ホモ二官能イミドエステル、および二官能マレイミド環を含む。メチル-3-[(p-アジドフェニル) シチオ] プロピオニミドのような誘導体生成試薬は、光の存在下で吸着を形成することのできる光活性化中間体を生成させる。別法として、臭化シアン活性炭水化物のような反応性水不溶性マトリックスおよび米国特許第3959642; 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537; 4055635; および4330440号に記載の系反応性基質も、蛋白の固定化および薬理に使用される。

或る種の翻訳後修飾は、発現されたポリペプチドに対する組み替え宿主細胞の作用の結果である。グルタミンおよびアスパラギン残基はしばしば翻訳後アミド化されて対応するグルタミン酸およびアスパラギン酸残基となる。これとは別にこれらの残基は緩やかな酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれの型も本発明の範囲内にある。

その他の翻訳後修飾には、プロリンおよびリジンのヒドロキシ化、セリンまたはスレオニン残基のヒドロキシ基のホスホリル化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン残基の α -アミノ基のメチル化が含まれる[T. E. クレイトン、プロテインズ: ストラクチャー・アンド・モレキュラー・プロパティーズ (Proteins: Structure and Molecular Properties), W. H. フリーマン・アンド・Co., サンフランシスコ, 79-86頁(1983)]。

その他の誘導体は、非蛋白性ポリマーに共有結合で結合した本発明に係る新規

、およびアブリンおよびリストン、CRC Crit. Rev. Biochem.、259-306頁(1981)に記載されている。

HGF変異体上に存在する炭水化物置換基は、化学的または酵素的に除去することもできる。化学的脱グリコシル化は、トリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物への暴露を必要とする。この処理は、結合糖以外の殆どのまたは全ての糖の脱離をもたらすが、ポリペプチドは無傷のままである。化学的脱グリコシル化は、ハキムジン等、Arch. Biochem. Biophys.、259巻52頁(1987)およびエッジ等、Anal. Biochem.、118巻131頁(1981)により記載されている。炭水化物置換基は、ソクラ等、Meth. Enzymol.、138巻350頁(1987)により記載されるような種々のエンドおよびエキソグリコシダーゼによって除去することができる。グリコシル化は、グズキン等、J. Biol. Chem.、257巻3105頁(1982)により記載されるようにフニカマイシンにより阻害される。フニカマイシンは糖-N-グリコシダーゼ結合の形成を遮断する。

本発明に係るアミノ酸配列変異体のグリコシル化変異体は、適当な宿主細胞の選択によっても生成させることができる。例えば母体は哺乳動物系とは異なる異なったグリコシル化を導入する。同様に、セレクトイン変異体の供給源とは異なる種（例えばハムスター、マウス、昆虫、魚、牛または羊）または組織（例えば肝臓、脾臓、リンパ、間葉または血液）の組織を有する哺乳動物細胞が、変異体にグリコシル化を導入する能力について精密的にスクリーニングされている。HGF変異体分子の共有結合的結合は本発明の範囲内に包含される。このような修飾は、HGF変異体の鎖的アミノ酸残基を、選ばれた鎖または末端残基と反応し得る官能基誘導体生成試薬と反応させることによって、または選ばれた組み替え宿主細胞に最近の翻訳後修飾の機構を利用することによって、正常的に導入される。得られた共有結合的誘導体は、生物活性、HGF変異体のイムノアッセイ、または組み替え糖蛋白の免疫原性阻害用のHGF抗体の製造、に重要な残基の同定を目的とする肝臓に有用である。例えば、ニンヒドリンとの反応後のこの蛋白の生物活性の完全な失活は、少なくとも一つのアルギニンまたはリジン残基がその活性のために決定的であることを示唆し、その後、選択された条件下で修

HGF変異体を含む。非蛋白性ポリマーは通常、親水性合成ポリマー、即ち天然では見いだされないポリマーである。しかしながら、天然に存在し、組み替えまたはインビトロ法によって生成されるポリマーは、天然から単離されるポリマーと同様に有用である。親水性ポリビニルポリマー、例えばポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドン本発明の範囲内にある。特に有用なのは、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールのようなポリビニルアルキレンエーテル類である。

HGF変異体は、米国特許第4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192または4179337号に開示される方法によって、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレン類のような種々の非蛋白性ポリマーと結合させることができる。

HGF変異体は、例えばコアセレーション技術または界面重合により製造されるマイクロカプセルに、コロイド懸液デリバリー系（例えばリポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）、またはマクロエマルジョンに封入することができる。このような技術はレミントン・ファーマシューティカル・サイエンス (Remington's Pharmaceutical Sciences) 16版、A. オソール編(1980)に開示されている。HGF変異体配列は、前記に定義された免疫グロブリン不変ドメイン配列に結合させることができる。得られた分子は一般に、HGF変異体-免疫グロブリンキメラと称する。このようなキメラは、本質的にはWO91/08298号(1991年6月13日公開)に記載のように組み立てることができる。

通常、HGF変異体は、免疫グロブリンの不変領域のN末端に、可変領域に代わってC末端が融合するが、セレクトイン変異体のN末端融合もまた望ましい。好ましくは、HGF変異体の重鎖領域は融合の際に不活性化または除去される。

典型的には、このような融合は、少なくとも、免疫グロブリン重鎖の不変領域の恒定的に活性なヒンジ、CH2およびCH3ドメインを保持する。融合は、さらに、不変ドメインのFc部分のC末端に、または重鎖のCH1もしくは軽鎖の対応領域のN末端に直接行なわれる。これは通常、適当なDNA配列を組み立て、

それを組換え細胞培養中で発現させることによって達成する。しかしながら別法として、本発明に係るHGF受容体-免疫グロブリンキメラを既知の方法に従って合成することもできる。

融合がなされる正確な部位は重要でない。個々の部位は良く知られており、HGF受容体の生物活性、分泌または結合特性を最適とするように選択することができる。

幾つかの形態において、ハイブリッド免疫グロブリンは、本質的にはWO91/08298号(上記)に開示されるように、単量体、またはヘテロもしくはホモ多量体として、そしてとりわけ四量体の二量体として組み立てられる。

好ましい形態においては、HGFレセプターのための結合部位を含む配列のC末端を、免疫グロブリン、例えば免疫グロブリンG₁のエフェクター領域を含む、抗体のC末端部分(特にFcドメイン)のN末端に融合させる。重鎖不変領域全体をレセプター結合部位を含む配列に融合させることは可能である。しかしながら、より好ましくは、 μ ハイン領域(これはIgG-Fcを化学的に規定し、重鎖不変領域の最初の残基を114とする時の残基216【コベット等、上記】、または他の免疫グロブリンの類似配列である)のすぐ上流のヒンジ領域で始まる配列を融合に使用する。特に好ましい形態においては、レセプター結合部位を含むアミノ酸配列を、IgG₁、IgG₂またはIgG₃重鎖のヒンジ領域およびC_H2およびC_H3またはC_H1、ヒンジ、C_H2およびC_H3ドメインと融合させる。融合が行なわれる正確な部位は重要でなく、最適な部位は慣習的な実験により決定することができる。

HGF受容体-免疫グロブリンキメラは、例えば、プロテインA精製、免疫組織化学、および免疫沈降技術において、抗HGF抗体に代わって使用することができ、HGF-HGFレセプター相互作用の阻害剤のスクリーニングを容易にすることができる。治療学的には、これらは対応するHGF受容体分子と比較して、より低い半減期といったような利点を付与することが期待される。

IV. 治療用組成物

増強されたレセプター結合親和性を有するHGF受容体を使用し、野生型HGFがそのレセプターに結合することを遮断することができる。これにより、H

Gレセプターの活性化に付随する病理学的状態、例えば慢性のHGFレセプター活性化に付随する癌性腫瘍の処置が可能となる。

本発明に係る化合物は、HGF生成物を薬学上許容し得る媒体と合することによる既知の方法に従って調合し、薬学上有用な組成物を製造することができる。好適な媒体およびそれらの製剤は、オスロ等により開示されたレミントンズ・ファーマシューティカル・サイエンス(Remington's Pharmaceutical Sciences)、16版、1980、マッパ・パブリッシング・Co.に記載されている。これらの組成物は、典型的には、HGF受容体の有効量、例えば約0.5ないし約10mg/ml程度を適当量の媒体と共に含有させ、患者への有効な投与に好適な薬学上許容し得る組成物を製造する。受容体は、経口的に、または有効な形で血漿まで運搬されることが望ましい態の方法によって投与することができる。

本発明の実施に使用されるHGF受容体の配列配列に特に適した組成物は、無菌水溶液または凍結乾燥蛋白のような無菌の水和され得る粉末を包含する。典型的には、適当量の薬学上許容し得る塩もまた、その製剤を等張とするために、製剤中に使用される。

本発明に係る薬用組成物の用量および所要の薬物濃度は、個々の患者の用途に応じて変わり得る。ラットの実験における典型的な有効用量は、腹腔内投与注射として投与される約250 μ g/kgである。当分野で知られる、例えばモーデンティ等、Pharmaceutical Res., 8巻1351頁(1991)およびそこに引用されている参考文献に開示されるような方法で、用量の種間比較を行なうことができる。

以下の実施例は本発明の実施のために現在考えられる最良の様式を示唆するに過ぎず、本発明を限定するものと解すべきではない。

V. 実施例

プロホルモンから α/β 二量体への開裂ならびにクリンダルおよびプロチアゼドドメインの構造および機能的な重要性を決定するため、一連の組換えh_uHGF(r_huHGF)受容体を生成させた。突然変異は、CMVを基盤とする発現プラスミドでh_uHGF cDNA中に導入し、各受容体を発現しているヒ

ト293細胞の安定な細胞株からの条件培養を、HGF受容体の大きさおよび発現のレベルを監視するためのウェスタンブロッティングによって検定した。

各h_uHGF誘導体の濃度を二つの型のサンドイッチELISA検定により確認した。ELISAにより判明した発現レベルの相違はウェスタンブロット上に観察された相違と相関した。殆どの受容体について、発現のレベルは1-5mg/mlの範囲であった。発現レベルが0.6mg/mlより低い受容体については、その条件培養を最適化した。

次に、一次培養中の肝細胞における分泌促進活性およびHGFレセプターに結合する能力を測定した。HGFレセプターの細胞外ドメインをヒトIgGの不変領域(Fc)に融合させ、結合を培養中で実施した。

r_huHGF受容体の組み立て、検定方法および種々の突然変異体によって得られた結果の分析を以下の実施例に記載する。

実施例1

h_uHGF受容体の組み立て

A. 位置指定突然変異誘発

プラスミドDNAの分離、ポリアクリルアミドおよびアガロースゲル電気泳動を、サムブルック等、上記に開示されるように実施した。

CMVプロモーターを有する哺乳動物発現プラスミドpRK5.1(ジェンテク・Inc.)を、培養中にHGF受容体の分泌をさせるh_uHGFの突然変異誘発に使用し、生物活性および結合について直接検定した。この発現ベクターはpRK5の誘導体であり、その組み立ては、1989年3月15日公開のEP307247号に開示されている。このpRK5.1ベクターをコードしているヌクレオチド配列を図5(配列番号1)に示す。

使用されたh_uHGF cDNAは、前に公開された728アミノ酸型に相当する(ミヤザワ等、1989、上記)。

突然変異誘発は、入手し得る市販の大腸菌dut⁻ung⁻菌株を用い、クンケルの方法に従って実施した(クンケル等、Method. Enzymol., 154巻367-382頁(1987))。インビトロ突然変異誘発およびプライマーの配列決定に用いられるオリゴヌクレオチドは、アブライド・バイオシス

テム・380A-DNA合成機を使用し、記載のようにして調製した【マテウツ等、J. Am. Chem. Soc., 103巻3185-3191頁(1981)】。所望の突然変異体を作り出すために、所望のアミノ酸置換をコードしている配列のオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーとして使用した。このオリゴヌクレオチドを、標準的方法によって生成された一本鎖pRK5.1-h_uHS Aとアニーリングした(ヴィエラ等、Method. Enzymol., 142巻3頁(1987))。

3種のデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン(dATP)、デオキシリボグアノシン(dGTP)、およびデオキシリボチミジン(dTTP)の混合物を、製造者によりキットで供給されるdCTP(aS)と呼ばれる塩基チオデオキシリボスレオシンと合し、一本鎖pRK5.1-h_uHGFに加え、これに該オリゴヌクレオチドをアニーリングした。

この混合物にDNAポリメラーゼを加えると、突然変異を受けた塩基以外はpRK5.1-h_uHGFと同一のDNA鎖が生成した。さらに、この新たなDNA鎖はdCTPの代わりにdCTP(aS)を含む。これが制限エンドヌクレアゼ消化から保護する役割を果たした。ヘテロ二本鎖の終端に相当する制限酵素で切れ目を入れた後、この制限酵素ExoIIIヌクレアーゼにより、突然変異誘発オリゴマーを含む領域を過ぎて消化した。次いで分子のハット(hat)を部分的に一本鎖にしたまま反応を停止した。次に、4種の全デオキシリボヌクレオチド三磷酸、ATP、およびDNAリガーゼの存在下で、完全な二本鎖DNAホモ二本鎖分子をDNAポリメラーゼによって生成させた。

以下のオリゴヌクレオチドを調製し、pRK5.1-h_uHGF受容体分子の生成のためのプライマーとして使用した：

R494E h_uHGF: TTGGAATCCCATTTTACAACTCCAGTTTCTTTCTTTGCCAAGAT

(配列番号2)

R494D h_uHGF: CAATCCCATTTTACAACTCCAGTTTCTTTCTTTGCCAAGAT

(配列番号3)

R494A h_uHGF: CCAATTTTACAACTCCCAATTTCTTTCTTTGCCAAGAT

(配列番号4)

表7-508420 (11)

Q534B huEGF: AGAAGGGAACAGTGTCTGCA	(配列番号5)
Y673S huEGF: AGTGGGCCACGAGATCCCT	(配列番号6)
V692S huEGF: TCCAGCAAGGAGAAATGACAC	(配列番号7)
ΔE1 huEGF: GCATTCACCTTCTGAGTTCTAATGTAGTC	(配列番号8)
ΔE2 huEGF: CATAGTATGTCACCTCACTTCTGAACA	(配列番号9)
ΔE3 huEGF: TCCATGTCACATATCTCAGTTGTTTCCAA	(配列番号10)
ΔE4 huEGF: TGTGCTATCAGCTTCACTGTGCTATGTA	(配列番号11)
N-303 huEGF: ACGTTGCAATGCAATAGTTCTTC	(配列番号12)
N-384 huEGF: TTGTCATGTCATTAATCAGCT	(配列番号13)
α-鎖: GTTCGTTGGGATCCATTACCTATGCCAATTG	(配列番号14)

Y673S, V692S huHGF変異体は、この2つの突然変異を作るために用いられる両方のオリゴヌクレオチドを使用し、鋳型としての野生型huHGFから得た。

上のプロトコルを用いて生成された突然変異体huHGF組み立て物を、コンピテントな細胞の調製および形質転換のための標準的塩化カルシウム法(サンプルク等、上記)を用いて、大腸菌感受性株MM294tonAに導入した。MM294tonA(これはT1ファージに対して耐性である)は、Tn10トランスポゾンのtonA遺伝子への挿入およびこれに続く不正確な切り取りによって調製された。次いでこの遺伝子を、トランスポゾン挿入突然変異検出(クレック

ナー等、J. Mol. Biol., 116巻125-159頁(1977))を用いて大腸菌感受性株MM294(ATCC31446)に導入した。

サンプルク等、上記、の標準的ミニプレプ法を用いた細菌形質転換体の個々のコロニーからのDNA抽出。このプラスミドをセファクリルCL8Bスピンカラムを通してることによりさらに精製し、次いで、配列決定ならびに制限エンドヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動によって分析した。

B. ヒト胚腎293細胞のトランスフェクション。

正しい配列を有するプラスミドを用いてヒト胚腎293細胞を塩酸カルシウム法によってトランスフェクトした。293細胞は6ウェルプレートに70%密度となるまで増殖させた。huHGFプラスミドDNA変異体2.5μgを1mMトリス-HCl, 0.1mM EDTA, 0.227M CaCl₂ 150μlに溶解した。ここに50mM HEPES緩衝液(pH7.35)、280mM NaCl、1.5mM NaPO₄ 150μlを加え(懸液しながら)滴下する。25℃で10分間沈降を生成させた。次いで、懸液した沈降を、6ウェルプレート中の個々のウェルに入った細胞に加えた。細胞の単層をこのDNA沈降の存在下に4時間インキュベートし、PBSで1回洗浄し、無血清培地で72時間培養した。安定な集団が形成されたならば、HGF cDNAを、エキソーム性CMV駆動発現プラスミドpCisEBONにサブクローニングした(製造はG. カシアンズ、C. ホー、R. ウェーバー、S. ウィリアムズ、D. ヴェッデルおよびD. リュン)。pCisEBONはpRK5誘導体であって、その基盤となっているタクロチド配列は図6(配列番号15)に示されている。この集団をネオマイシン選択培地で迅速選択した。

表7-508420

検定方法

他のいかなる既知の成長因子とも似ていない構造の分子であるHGFの多面的活性に鑑み、この因子とそのレセプターとの分子相互作用を理解することが重要である。実施例1に記載のように生成されたhuHGF変異体も、一次培養中で肝細胞のDNA合成を誘導する能力、およびhuHGFレセプターの可溶性型との結合について結合する能力を分析した。

A. 野生型huHGFおよびhuHGF変異体の蛋白定量

二つのモノクローナル抗体を用いる特異的二部位huHGFサンドイッチELISAを使用して、野生型組み立てhuHGF(WT rhuHGF)、一本鎖およびプロテアーゼ阻害変異体を定量した。微量定量プレート(マキシソープ、ナンク)を、50mM炭酸塩緩衝液、pH9.6に入れた10mg/mlのモノクローナル抗rhuHGF抗体A3.1.2(1gG2a表現型、親和性: 3.2×10⁻¹⁰mol/l)で、4℃で一晩浸漬した。プレートを、PBS中の0.5% BSA(シグマ)、0.01%チメロサル、pH7.4で過剰し、引洗後洗浄した後、迅速希釈したHGF試料を二つずつ調製し、平行してCHO-発現されたrhuHGF(40-0.1ng/ml)を標準として使用した。これら希釈液50μlを、1:1500に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートさせたモノクローナル抗rhuHGF抗体D4.3(1gG1表現型、親和性: 1.3×10⁻¹⁰mol/l) 50μlと共にRTで2時間同時にインキュベートした。0.04%オプフェニレンジアミンジヒドロクロリド(シグマ)および0.012%(v/v)過酸化水素(シグマ)をPBSに加えることにより、発色を誘発し、100mlを、洗浄したプレートにRTで15分間加えた。各ウェルに2.25M硫酸50mlを加えることにより、反応を停止させた。405nmにおける吸光度をバックグラウンドとして差し引いた490nmにおける吸光度を、微量定量プレート読み取り機で測定した(Vmax、モレキュラー・ディバイシズ、メンロー・パーク、CA)。このデータをジェネテック・Inc.の開発した四パラメータ曲線当てはめプログラムを用いて変形した。

HGFポリクローナルサンドイッチELISAを使用して、全てのクリングル除去およびC末端切除変異体を定量した。簡便に述べると、微量定量プレート(ナンク)を、5mg/mlのモルモットポリクローナル(抗CHO発現rhuHGF)1gG抗体調製物(ジェネテック・Inc.)で上記のように設置した。この抗体は、ウェスタンブロットの目視調査と比較する時、HGF先端切除型のみならずrhuHGFをも認識するので、HGF変異体の監視に理想的である。プレートを過剰し、293細胞上清の2倍濃度希釈液(1:103-6, 106)を加え、4℃で一晩インキュベートした。精製されたCHO発現rhuHGF(1

00-0.78ng/ml)を標準として使用し、平行してインキュベートした。プレートを洗浄し、同じポリクローナル抗体の1:500希釈(およそ400ng/ml)と共にインキュベートしたが、この場合は、変異体の検出のため西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートさせた(上記を参照されたい)。ウェスタンブロットリングを実施して、発現されたHGF変異体の大きさを測定した。これについては、標準的方法を用い、ポリクローナル1gG抗体調製物(500ng/ml)を使用してSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロットリングを実施した。化学ルミネッセンス検出法(アマージム)およびヤギ抗モルモット1gG-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート(1:5000)を、製造者の記載に従ってブロットの発色に使用した。

B. 可溶性HGFレセプター結合検定

HGFの肝細胞への結合に関する先の研究は、huHGFが高い親和性でその細胞表面レセプターに結合できることを示した(Kd=24-32pM; ヒグチおよびナカムラ、Biochem. Biophys. Res. Comm., 174巻831-838頁(1991))。本発明者等は、細胞表面膜タンパク質リンプロオグリカンへのHGFの非特異的結合の故に、可溶性型のレセプターを用いてHGF結合を調べることを選んだ[ナルディニ等、EMBO J., 10巻2867-2878頁(1991)]。

細胞上清(もし濃度が600ng/mlより低ければアミコンフィルターで濃縮する)を、293細胞から誘導され分泌される、ヒト1gGのFc不変域に融合させたヒトHGFレセプター(huHGF)の細胞外ドメインへの、CHO発現¹²⁵I rhuHGF(2-5×10³Ci/mmol、T. ソンチエク、ジェネテック・Inc.の好意により提供された)の結合を溶液内で迅速する能力について試験した。

1. huHGF rhuHGF 1gGキメラの組み立て

huHGF rhuHGFをコードしている全長のcDNAクローンを、cDNAライブラリーおよびPCR増幅から分離された部分的cDNAを結合することにより組み立てた。アミノ酸1-270に対するコード化配列を、50塩基のオリゴヌクレオチド(5'-ATGAAGGCCCGCTGTGCTTGCACCTGG

CATCCTCGTGCTCCTGTTTACC-3') (配列番号16) でスクリーニングされたヒト胎盤cDNAライブラリー (T.メイソン、ジェンテクにより提供された) から分離した。アミノ酸809-1390をコードしている配列は、オリゴヌクレオチドプローブ (5'-CACTAGTTAGGATGGGGACATGTCGTGCACAGGATACTGCACTTGTTCGCATGAA CCGT-3') (配列番号17) でスクリーニングされたヒト肝臓ライブラリー (ストラタジーン) から分離された。

ライブラリーの平板培養、ハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄に対する条件は記載の通りであった [ゴドフスキー等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86巻8083-8087頁 (1989)]。PCRを用いて、A549細胞からHGFの遺伝子271-808を含むcDNAクローン (c-met) を分離した。モネーマウス白血病ウイルス逆転写酵素およびベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズにより供給された緩衝液を使用する100 μ lの反応中で、HGFに対して特異的なプライマー (5'-TAGTACTAGCACTATGATGTCCT-3') (配列番号18) を用いる逆転写に、10 μ gの総RNAを使用した。この反応混合物の10分の1をPCR増幅に使用した。このPCR反応は、10 μ lの逆転写反応液、10mM KCl、20mM トリス-HCl (pH 8.8)、10mM (NH₄)₂SO₄、8mM MgSO₄、0.1%トリトンX-100、1UのヴェントDNAポリメラーゼ (ニュー・イングランド・バイオラブズ)、ならびに前進プライマー (5'-TTTACTTCTTGACGGTCCAAAC-3') (配列番号19) および逆行プライマー (5'-CAGGGGGAGTTGCAGATTTCAGCTGT-3') (配列番号20) 各々50 pmolを含有する100 μ l容量で実施した。30サイクルの反応 (95℃1分間)、アニーリング (55℃45秒間) および伸長 (72℃2分間) の後、PCR生成物を低融解温度アガロースゲルから回収した。全長のHGF r cDNAをベクターpRK7にサブクローニングし (1990年3月22日公開のWO90/02798号を参照されたい)、二本鎖DNA配列決定をジデオキシヌクレオチド法により実施した。

huHGFの細胞外ドメインのコード化配列を、二段階の工程でヒトIgG

1重鎖のそれに融合させた。PCRを用いて、HGF rアミノ酸299のコード化配列に対する3'に唯一のBstEII部位を有するフラグメントを生成させた。72℃で3分間の伸長時間、および40 ngの全長HGF r発現ベクターを鋳型として使用する外は上記のようにして、5'プライマー (ベクター中、HGF rコード化配列の上流に位置する) および3'プライマー (5'-AGTTTGTCTCGGTGACCTGATCATTTCTCATCTGGTTGAACCTATAC-3') (配列番号21) を、100 μ lの反応中で使用した。増幅の後、このPCR生成物をこの組み立て物の唯一のBstEII部位を介してヒトIgG-r 1重鎖cDNAに結合させた [ベネット等、J. Biol. Chem., 266巻23060-23067頁 (1991)]。得られた組み立て物は、BstEII部位 (アミノ酸VおよびTのコード化配列を添加する) を介してヒトIgG-r 1重鎖のアミノ酸216-443のコード化配列に融合された、huHGF rのアミノ酸1-929のコード化配列を含んでいた。この組み立て物の配列決定は上記のように実施した。

2. 融合後定

ウサギ抗ヒトIgG Fc特異抗体 (ジャクソン・イミューノリサーチ) 1mg/mlにより4℃で过夜した分可溶性低分子量プレート (ナック) で融合後定を実施し、プレートを0.05%トリン20 (バイオラド) を含有するPBSで注意深く洗浄した。0.1%BSAを含有するPBSで過剰した後、この同じ緩衝液に、ウェル当たり25mlの50 pM 125I-r huHGFを加えた。各ウェルに、50mlの細胞上清の過剰希釈液 (1:25-1:6000)、精製したCHO発現 huHGF (25000-0.064 pM) または増地を全く同じように加えた。続いて、50 pMのHGFレセプター: IgG融合蛋白25mlを加え、プレートを穏やかに揺動しながらインキュベートした。4時間後、平衡に達した時にプレートを洗浄し、ウェルをガンマカウンターで個別に計数した。非特異的に結合した放射活性の量は、HGFレセプター: IgGを500倍過剰の希釈液 huHGFとインキュベートすることによって判断した。各類似体の解離定数 (K_d) を、ELISAにより決定された huHGF濃度を使用し、本質的には記載のようにして (デブラッシュ等、1989 [?])、当てはめられ

た阻害曲線からIC50において算出した。

C. 生物学的検証

WT huHGFおよび変異体の生物活性を、一次培養中のラット肝細胞のDNA合成を誘導する能力によって測定した。肝細胞は、公開されている標準技術に少しの改良を加えて分離した [ガリソンおよびヘインズ、J. Biol. Chem., 150巻2269-2277頁 (1975)]。簡便に述べると、雌のスプレーグ・ドレイラット (160-180g) の肝臓を、0.02%コラゲナーゼIV型 (シグマ) を含有するCa⁺⁺ヘパース緩衝化塩水100mlにより、門脈から摘出した。20分後、この肝臓を摘出し、緩衝液に入れ、種やかに洗浄して肝細胞を結合組織および血管から分離し、ナイロンメッシュで濾過した。次に、細胞を遠心により洗浄し、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (100 mg/ml)、L-グルタミン (2 mM)、微量元素 (0.01%)、トランスフェリン (10 mg/ml) およびアプロチニン (1 mg/ml) を含有するウィリアムズ増地E (ジブコ) 中に1×10⁶細胞/mlで再懸濁した。精製されたCHO発現 huHGF (1-0.031 mg/ml)、293上清 (1:4-1:256) または増地のいずれかの2倍過剰希釈液の存在下で、肝細胞を96ウェル微量定量プレート (ファルコン) 中でインキュベートした。37℃で48時間インキュベートした後、0.5mCiの3H-TdR (15 Ci/mmol、アマーシャム) を各ウェルに加え、さらに16時間インキュベートした。細胞を濾紙上に収集し、これを洗浄し、乾燥し、シンチレーション液の添加後、ベックマン計数機で計数した。それぞれのhuHGF変異体について、単位/mgで表現される非活性 (SA) を、ELISAで得られるHGF濃度を用いた半最大増幅 (1単位/m) として定義する) において算出した。

D. A549細胞上でのチロシンホスホリル化の誘導

ヒト胎盤肝細胞 (A549) の単層を、10%胎児血清を含有するRPMI 1640増地で培養し、5%CO₂を含む加湿器気流下に37℃で維持した。血清飢餓細胞を200 ng/ml huHGFと共にまたは無しで37℃で5分間インキュベートし、30mM Hepes、150mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、1mM EGTA、10%グリセロール、1%トリトンX-

100およびプロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する緩衝緩衝液で抽出した。この溶液を抗Met COOH抗体によって免疫沈降させ、抗ホスホチロシン抗体でプロテティングした (上記のウェスタンブロットングを参照されたい)。

実施例3

開裂部位突然変異体の分析

プロテアーゼの開裂部位は、通常、P1位に塩基性残基を、そしてP'1位およびP'2位に二つの酸性性アミノ酸残基を含み、これらは開裂されるペプチド結合の後に残っている。提唱されたhuHGFの開裂部位 (P1 R494、P'1 V495、P'2 V496) はこの意見に合致する。本発明等は、P1 R494をD、E、またはAのいずれかに置換することによりhuHGFの開裂を遮断しようとした。これらの細胞において発現されるWT r huHGFの主要な型は、見かけの分子量89 kDaを有する α 鎖の存在により判断されるような二本鎖の物質に開裂される (図2)。還元条件下においてこれらの変異体は単一のバンドとして、予想される一本鎖HGFの大きき94 kDaに移動することから、これらの突然変異の各々はr huHGFのプロセッシングを遮断するらしく思われた。これらの変異体は、一次培養中の肝細胞の増殖を誘導する能力を全く欠いていた (図3A)。しかしながら、これらの変異体を、HGFレセプター: IgG融合蛋白との融合についてWT r huHGFと融合する能力を分析すると、それらの阻害曲線はWT r huHGFのそれと大体似かっていた (図3B)。これらの曲線から決定されたK_dは、WT r huHGFが高い親和性 (50-70 pM) でこの融合蛋白に結合することを示し、一方、全ての一本鎖変異体はWT r huHGFと比較しておよそ2ないし10倍のK_d (100-500 pM) を示した。WT r huHGFと比較した残余の肝細胞増殖活性およびレセプター結合能力としての、少なくとも三つの独立した検定の結果を第1表にまとめる。

本発明等の結合研究は、WT r huHGFが、ヒダチおよびナカムラ (1991) により肝細胞上に見いだされたものに類似の、単一クラスの高親和性結合部位 (50-70 pM) を有する可溶性レセプター融合蛋白と結合することを示した。しかしながら、この可溶性レセプターは実際には、IgGのFc部分に

あるヒンジのジスルフィド橋によって結合している二量体であることから、細胞上でのHGFの結合は多少異なるかも知れない。

全ての一本鎖変異体の特異活性 (SA) 対Kd比の直接比較は、これらが、試験された最高濃度において不活性であり (SA < 3%)、一方レセプター結合親和性は2-3の因子によって低下するものであることを示した。

これらの結果は、HGFの二本鎖型への開裂が分裂促進活性に必要であること、即ち、一本鎖HGFはプロマイトジェンであって、HGFの非開裂型は、親和性は低いものの、HGFレセプターに結合すること、強く立証している。

胎盤から分離された【ヘルナンデス等、(1992)、J. Cell Physiol.、印刷中】またはトランスフェクトされたCOS細胞中で発現された【ルビン等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88巻415-419頁(1991)】HGFの主要な型は、一本鎖型である。分裂促進活性で試験する時、この一本鎖型のHGFは生物学的に活性であることが見いだされている。本発明者等のデータと共に考え合わせると、この事は、この一本鎖HGFは分裂促進活性の関与は活性化されて二本鎖型となっていることを示唆している。

第二の所見は、本発明者等の融合結合決定により示されたように、一本鎖変異体はHGFレセプターと結合する実質的な能力を保持しているということである。この事により、一本鎖HGFは不活性な状態で細胞表面HGFレセプターにインビボで結合し、その後適当なプロテアーゼにより活性な二本鎖型に開裂され得るという興味深い可能性が出てくる。

実施例4

プロテアーゼドメイン突然変異の影響

HGFのプロテアーゼドメインの機能的な重要性を解明するために、可能性あるセリンプロテアーゼ活性部位を再構成するための単一、二重および三重突然変異を実施した。これらの変異体の組み立ては実施例1に記載されている。

本発明者等は、単一、二重または三重突然変異のいずれかとして、HGF残基Q534をHに、Y673をSに、またはV692をSに置き換えた。分裂促進活性およびレセプター結合に及ぼすこれらの影響の分析は、単一突然変異Q534Hはwt rhuHGF (それぞれ3.3 104単位/mgおよび70pM)

と比較した場合、SA (5.2 x 104単位/mg) またはKd (80pM) のいずれも有意に変化させないが、一方Y673SおよびV692Sは、SAをそれぞれおよそ5および10倍低下させることを示した。実際これら二つの変異体は、WT rhuHGFについて見られる最大プラトーに到達することはなかった (wt rhuHGFプラトーのおよそ50%)。興味深いことに、これらの変異体はWT rhuHGFと類似のKdを示した。他の二重および三重変異体も全てHGFレセプターに結合させる能力を保持していたが、明らかに低下したSAを示した (第1表)。二重変異体Q534H、Y673SおよびY673S、V692Sならびに三重変異体Q534H、Y673S、V692Sの残余SAは、WT rhuHGFと比較して3%より低かった。しかしながら、これらの変異体のKdはWT rhuHGFと有意に異なっていない (第1表)。これらの変異体は、HGFのβ鎖内部の突然変異は分裂促進活性を遮断するが、それでも尚これらはHGFレセプターに結合できることを示している。したがって、これらの突然変異体は、レセプター結合に強く活性の点では不完全である。これらの結果は、β鎖はレセプター結合にとって必要ではないが、或る程度 (例えばY673およびV692) はHGFの構造および/または活性にとって決定的であることを示している。活性残基Sによる非活性残基V692の置換は、セリンプロテアーゼにおいて見いだされるように活性部位残基D594に対する新たな水素結合が導入されたならば、構造的特異性をもたらしただけかも知れない。より小さい残基SによるY673の置換もまた、最上かの局所的構造修飾を導入し得る。これに対して、活性残基Q534を似かよった大きな別の活性残基Hで置換しても、この残基が露出されるようなHGFコンホメーションの劇的な相違をもたらしそうもなく、事実Q534H変異体はrhuHGFと類似であった (第1表)。

実施例5

C末端およびクリングル除去の影響

α鎖がHGF結合または活性にとって必要であるか否かを確認するために、実施例1に記載されるようにC末端切除を行ない、α鎖のみを含む変異体、または第三 (N-384) もしくは第二 (N-303) クリングルの後で先端切除した

変異体を生成させた。

β鎖を除去または図1に示される逆読する番号のクリングルに加えてβ鎖を除去することによって、HGFのC末端切除を機つか実施した。第一クリングルを伴うN末端ドメインに相当する一つの変異体 (N-207) は、ウェスタンブロッティングまたはポリクローナル抗体製造を用いるELISAのいずれによっても検出されるレベルの蛋白を発現せず、したがってこれはこれ以上調べなかった。HGFの最初の二つのクリングル (N-303)、三つのクリングル (N-384) または完全なα鎖を含む変異体の発現は、250-600ng/mlと低かった。WT rhuHGFと比較したこれらの変異体の残余SAおよびKdの一覧を第1表に示す。試験された濃度において、バックグラウンドレベルより高い活性は観察されず、この事は、これらの変異体が生物活性を失っていることを示すものである。しかしながら、結合親和性は、変異体N-303、N-384またはα鎖が実質的な結合能力を保持している (WT rhuHGF結合と比較して23%まで) 事を示した。したがって、HGFのN末端の272の残基 (変異体N-303の成熟型) が、HGFレセプターとの高親和性結合にとって充分である。各クリングルドメインの除去の結果を第1表に示す。HGFの第一クリングルの除去 (変異体ΔK1) は生物活性に最も大きく影響し、少なくとも100倍の低下 (SA < wt rhuHGFの0.2%) を示した。同様に、この変異体の結合もまた、2mg/mlまでは結合についてwt rhuHGFと結合しないといったような影響を受けた。全ての他のクリングルの除去 (変異体ΔK2、ΔK3またはΔK4) もまた、著しく低下した分裂促進活性を誘発した (第1表)。しかしながら、これらの除去変異体のKdは、wt rhuHGFで観察されるそれと近いままであった。

これらのデータは、クリングルK3およびK4はレセプター結合に必要なことを示している。本発明者等のデータは、アミノ酸配列がHGF/NK2と極めて類似している変異体N-303がHGFレセプターとの結合について有効に結合する能力を保持している (Kd=280pM) という意味において、マヤフ等、1991、上記およびチャン等、1991、上記、による先の観察を支持するものである。さらに、N-303はレセプターへの結合にとって充分である

という知見、および第二クリングルはHGFレセプターへの結合に必要な (α鎖分子の残部という状況において) という知見は、レセプター結合ドメインがhuhGFのフィンガーおよび第一クリングル内に含まれるということを示唆する。通惑く本発明者等はこの変異体の発現を本発明者等のポリクローナル抗体を用いて検出することができなかったが、これは、その変異体N-207 (第一クリングルの後で除去) が293細胞で発現されないことを示唆している。

実施例6

huhGFレセプターのチロシンホスホリル化の誘導

本発明者等は、HGFレセプターにインビトロで結合する分裂促進活性については不完全な変異体R494EまたはY673S、V692Sが、A549細胞においてHGFレセプターのチロシンホスホリル化を刺激するかどうかを決定した。血清刺激細胞を、得られたWT rhuHGFまたは変異体で処理し、HGFレセプターの免疫沈降物をホスホチロシン抗体でブロッティングおよびロービングした。wt rhuHGFによる刺激は、HGFレセプターの145kDaβ-サブユニットのチロシンのホスホリル化を導いた (図4)。いずれの変異体も、HGFレセプターのホスホリル化を誘導する低下した能力を喪失した。

HGFによるHGFレセプターβ-サブユニットに対するチロシンホスホリル化の刺激はかつて報告された【ボッターロ等、Science、251巻802-804頁(1991)、ナルディー等、1991、上記】。本明細書中のデータは、変異体R494EおよびY673S、V692Sは可溶性HGFレセプターに結合させることができるが、1gG蛋白はインビトロでA549細胞におけるチロシンホスホリル化の刺激には有効でないことを示している。この結果の一つの解釈は、これらの変異体はA549細胞上のHGFレセプターを結合させることはできるが、有効なホスホリル化の誘導に必要な機軸、例えばレセプターの二量体化という点では不完全であるという事である。上皮および血管由来の成因子のような、内因性チロシンキナーゼを有する他のレセプター蛋白について、キナーゼ機軸の活性化にはレセプター-レセプター相互作用または二量体化が必要であることが示されている [総説についてはウルリッヒおよびシュレジンガー、Cell、61巻203-212頁(1990)を参照されたい]。そう

ではなく、これらの変異体は、細胞一面面付随HGFレセプターを融合させることができないのかも知れない。

HGFの特異な構造は、この分子の生物活性を調節する複数の事象があり得ることを示唆している。調節の初期段階は、生物学的に活性な二本鎖型を生成するための開環工程であろう。開環後、単にレセプター結合を調節するのではなく、HGFレセプターの活性化に要するその後の事象を調節しているかも知れない。本発明等のデータはさらに、レセプター結合によって絶対に必要である訳ではないが、レセプター活性化工程に寄与していることを示唆している。これらの変異体は、HGFレセプターにおける阻害となる事象の分析に有用であり得る。

実施例7

ヘアピンドメインおよびクリンクルドメイン変異体

第2変および第3変に列挙されるh u HGF変異体を作成し、それらの特異活性(SA)およびKd比を前記実施例の記載と本質上同様に決定した。

上の記載は例々の好ましい態様についてのものであるが、本発明はこれらに限定されないことが理解できるであろう。本発明の概念的な概念を逸脱することなく、開示される態様に様々な修飾が施され得ることが当業者には考えられるであろう。このような修飾は全て本発明の範囲内にあることが意図される。

表1

変異体(var)	SAvar/SAwt +/S.D.	Kdvar/Kdwt +/S.D.
一本鎖		
R494A	<0.03	0.82+/0.18
R494D	<0.03	0.31+/0.21
R494E	<0.02	0.31+/0.13
プロテアーゼ		
Q534G	1.19+/0.44	1.48+/0.85
Y672S	0.27+/0.07*	1.35+/0.72
Y692S	0.08+/0.04	1.02+/0.13
Q534R, Y673S	<0.03	2.24+/1.11
Y672S, Y692S	<0.02	1.76+/0.63
Q534R, Y673S, Y692S	<0.02	1.91+/1.28
C末端切除		
R-303	<0.05	0.23+/0.03
R-384	<0.05	0.25+/0.02
α鎖	<0.04	0.25+/0.03
クリンクル除去		
ΔX1	<0.002	<0.03
ΔX2	<0.05	0.41+/0.18
ΔX3	<0.03	0.59+/0.35
ΔX4	<0.07	0.85+/0.49

*は、変異体の分裂促進活性が野生型h u HGFと同じ絶対レベルに至らなかったことを意味する。

表2

HGF変異体	n	SA wt/wt +/S.D.	n	Kdwt/mut
wt rh uHGF	3	1	3	1
K137A	3	1.12+/0.10	3	0.98+/0.04
K144A, I145A	3	0.93+/0.18	3	1.03+/0.08
E159A	3	<0.02	3	<0.03
S181A	3	0.15+/0.03*	3	0.05+/0.04
P162A, L163A, S165A, S166A	3	<0.02	3	0.05+/0.02
F162A	3	0.04+/0.01*	3	0.05+/0.01
L163A, S165A, S166A	3	0.14+/0.08	3	1.10+/0.04
Y167A	3	1.22+/0.22*	3	0.82+/0.05
Y167F	3	0.38+/0.03*	3	1.02+/0.02
Y*Y15-Y167A	3	<0.02	3	<0.02
Y*Y15-Y167F	3	0.11+/0.02	3	1.01+/0.13
R168A	3	0.83+/0.07	3	0.98+/0.04
Q173A, E174A, N175A	3	0.33+/0.07*	3	0.21+/0.02
Q173A	3	0.13+/0.03*	3	0.15+/0.05
E174A	3	0.84+/0.11	3	0.89+/0.02
R181A, E183A, E184A	3	0.52+/0.08	3	0.95+/0.04
N193A, E195A, R197A	3	<0.02	3	<0.04
N193A	3	0.45+/0.12	3	0.62+/0.20
R195A	3	0.10+/0.06	3	0.17+/0.05
R197A	3	<0.01	3	<0.03
Y198A	3	0.88+/0.08	2	0.77

*は、変異体の分裂促進活性が野生型h u HGFと同じ絶対レベルに至らなかったことを意味する。

表3

ヘアピンドメイン内またはその近傍に酸化を有する変異体

HGF変異体	n	SA +/- wt/wt	n	Kd wt/mut
wt rh uHGF	3	1	3	1
Y*Y15-Y167A	3	<0.01	3	<0.02
K24A, E35A, R36A	3	0.71+/0.33	3	0.95+/0.03
K52A, D54A	3	0.22+/0.03*	3	0.95+/0.03
K52A	3	0.19+/0.03	3	0.89+/0.05
D54A	3	0.13+/0.01	3	0.79+/0.10
K58A, E60A, K62A, K63A, N65A	3	0.96+/0.12	3	0.99+/0.07
R72A, R76A, R77A, K78A	3	0.04+/0.07	3	0.63+/0.11
K109A, K110A, E111A	3	0.98+/0.04	3	0.78+/0.02
R114A, E115A, D117A	3	<0.02	3	<0.04
R114A	3	0.16+/0.04*	2	0.59
E115A	3	0.20+/0.03*	2	0.47
D117A	3	0.02*	2	0.14
R126A, R127A	3	0.23+/0.14	3	0.87+/0.12

*は、変異体の分裂促進活性が野生型h u HGFと同じ絶対レベルに至らなかったことを意味する。

配列表

(1) 一般的情報

(i) 特許出願人: ジェネンテック、インコーポレイテッド

ゴドウスキ、ポール・ジェイ

ロッカー、ナサリー・エイ

マーク、メラニー・アール

(ii) 発明の名称: 肝細胞成長因子受容体

(iii) 配列の数: 21

(iv) 連絡先:

(A) 名称人: ジェネンテック、インコーポレイテッド

(B) 通り: ポイント・サン・ブルーノ・ブルバード460番

(C) 市: サウス・サン・フランシスコ

(D) 州: カリフォルニア

(E) 国: アメリカ合衆国

(F) ZIP: 94080

(v) コンピューター解読書式

(A) 媒体型: 5.25インチ、360Kbフロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC適合

(C) オペレーティング・システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: Patla (ジェネンテック)

(vi) 本出願のデータ:

(A) 出願番号:

(B) 出願日:

(C) 分類:

(vii) 優先権主張出願のデータ:

(A) 出願番号: 07/884811

(B) 出願日: 1992年5月18日

(vii) 優先権主張出願のデータ:

(A) 出願番号: 07/885971

(B) 出願日: 1992年5月18日

(viii) 弁理士/代理人情報

(A) 氏名: ドレジャー、ジンジャー・アール

(B) 登録番号: 33,055

(C) 参照/登録番号: 755,779P1

(ix) 電話連絡先情報:

(A) 電話番号: 415/225-8216

(B) ファックス番号: 415/952-9881

(C) テレックス: 910/371-7168

(2) 配列番号1の情報:

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 4732

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号1:

TTGAGCTCG CCGCAGTTC ATTATGACT AGTTATTAT AGTATCAAT 50
 TAAGGGGTCA TTAGTTGATA GGCATATAT GCAATTGCG GTTACATAC 100
 TTACGCTAAA TGGGGGCGT GCGTCAGCC CCAAGGAGC CGGCGCATG 150
 AGCTCAATAA TGAAGTATG TCCATAGTA AGGCAATAG GCACTTTCC 200
 TTGAAGTCAA TGGGTGAGT ATTTAGGTA AACTGGGAC TTGCGATAC 250
 ATCAAGTGA TCATATGCA AGTAAGGCG CTAATGAGT CAATGAGGT 300
 AAATGGGCG CCGGCTTA TGGCAGTAC ATGAGCTTAT GGCATTTCC 350

TACTGGCAG TACATCTAG TATTAGTAT CGGTATTAC ATGCTGATC 400
 GGTTTTGCA GTACATCAAT GCGGCTGAT AGCGTTTCA CTCAGGGGA 450
 TTTCAGTC TCACGCTCAT TGAGCTCAAT GCGAGTTGT TTTGCGACA 500
 AAATCAAGG GACTTTTCCA AATGCTGTA CACTGCGCC CCAATTGAGC 550
 AATGGGCGG TAGGCTGTA GGTGGGAGC TCTATATAA CAGAGCTGT 600
 TTAGTGAAC GTGAGATGC CTGGAGGCG CATCGCGCT GTTTGAGCT 650
 CCATAGAAG CACGGGAGC GATCAAGCT CCGGGGCGG GAACGCTCA 700
 TTGGAAGCG GATTCGCGT GCAAGAGTC AGTAAGTAC GCGCTATAG 750
 GTCTATAGC CCAAGGCTT GCGTTGTTA GAAGCGGCT ACAATTAATA 800
 CATAACCTA TGTATCATC ACATAGGAT TAGCTGACG TATAGATAA 850
 CATCACATT GCGTTTCTG GACAGGTTG CCACTCCAG GTCCAACTG 900
 ACCTGGGTC TATGATGTA ATTCGCGCG GATGCTTAG AGTGACCTG 950
 CAGAAGCTG CCGGAGGCA AGCTGGGCG CCAAGGCGA ACTGTTTAT 1000
 TCGAGCTTAT AATGCTTACA AATAAGCAA TAGCATACA AATTTCACA 1050
 AATAAGCAT TTTTCACTG CATCTAGTT GTGTTTGTG CAAACTCAT 1100
 AATGTATCT ATCATGTCT GATGATCGG GAATTAATC GCGGAGGAC 1150
 CATCGGCTG AATAAGCTT GAAAGAGGA CTGGTTAGG TACCTTCTG 1200
 GCGGGAAGA ACCAGCTGT GAATGCTGT CAGTTAGGT CTCGAAACT 1250
 CCGAGGCTC CCGAGGCA GAAGTATCA AGCATGCAT CTCATTAGT 1300
 CAGCAACCA GTGTGGAAG TCCGAGGCT CCGAGGAGG CAGAAGTAT 1350

CAAGCATGC ATCTCAATTA CTCAGCAAC ATAGTGGCG CCGTAAGTC 1400
 GCGCATGCG CCGTAAGTC CCGGAGTTC CCGGAGTTC CCGGAGTTC 1450
 GCTGATTAAT TTTTATTAAT TATGAGAGC CCGAGGCGC CTGGGCTCT 1500
 GAGCTATTC AGAAGTATC AGAAGGCTT TTTGAGGCG TAGGCTTTG 1550
 CAAAGAGCTG TTAAGAGCT GCGAGTGGC GTGTTTATC AAGTGTGTA 1600
 CTGGGAAAC CCGGCTTGA CCGAGTGA AAGGCTTGA CAGATGCGC 1650
 CCGTGGGAG CTGGGTAAT AGCAAGAGG CCGGAGGCG TAGGCTTTG 1700
 CAAGCTTGC GTAGCTGAA TGGGAGTGC CCGGAGTGC GTATTTTCT 1750
 CCGTGGGAG CTGGGCTTA TTTGAGGCG CATAGGCAA AGCAAGCAT 1800
 GTAGGCGCG TGTAGGCGG CATTAAGCG GCGGAGGCG GTGTTTATC 1850
 GCGAGGAGC GCGTACACT GCGAGGCGC TAGGCGGCG TCGTTTCTG 1900
 TTCTTGGCT CCGTTTCTG CAGGTTGCG GCGTTTCTG GTCAAGCTG 1950
 AAATGGGCG CCGGCTTGA GGTGGGATT TAGGCTTGA CCGGAGTGC 2000
 ACCGAGGAA ACTGATTTG GGTGATGCT CAGGAGTGC GCGATGCGC 2050
 TGATAGAGG TTTTGGCGC TTTGAGGCT GAGTGCAGT TCTTTAATG 2100
 TGAAGCTTG TTTGAGGCT GAGGAGTGC CAGGAGTGC TCGGCTTAT 2150
 CTTTGTATT ATAGGCTT TTTGAGGCT CCGGAGTGC GTTAAAGAT 2200
 GAGGCTGATT ACAAAGAT TAAAGGAT TTTAAGGAT TATTAAGCT 2250
 TACAATTTA TCGGAGTGC TCAATGATC CTGCTTATG GCGGAGTGC 2300
 TAAAGGAGT CCGGATGCG TCGGAGTGC GGTGATGCT GCGGAGGAG 2350
 ACCGAGGAG ACCGAGTGC CCGGAGTGC GCGGAGTGC GCGGAGGAG 2400

TCGCTTACA GACAGCTGT GACGCTCC GGGAGTGCA TGTCTCAG 2450
 GTTTTCACCG TCATACCGA AACCGCGAG GCATTTCTT TGAAGACAA 2500
 AGGGCTCGT GATAGCGTA TTTTATAGG TTAATGTAT GATAATAAT 2550
 GTTCTTACA CTTAGCTGG CACTTTTGG GGAATGTGC GCGAAGCCG 2600
 TATTTCTTA TTTTCTAAA TACATTCAA TATGTATCC CTCATCAGC 2650
 AATAACCTG ATAAATCTT CAATAATAT GAAGAAGAA GACTATGAT 2700
 ATTCAACAT TCGGTGTGC CCTTATTCG TTTTGTGGC CATTTTCCG 2750
 TCGTGTCTT GCTACCCAG AACCGCTGT GAAAGTAAA GATCTGAAG 2800
 ATCAGTTGG TCGAGAGTG GTTACATCG AACTGATCT CAACAGCGT 2850
 AAGATCTTG AGATTTTGG CCGGAAGAA CTTTTCCAA TGAAGAGAC 2900
 TTTTAAAGT CTGATGTG GCGCGTATT ATCGGTGAT GACCGGGCG 2950
 AAGAGCACT CCGTGGCGG ATACACTAT CTACAGATG CTGCTTGAG 3000
 TACTCACAG TCACAGAAA GCATCTTAC GATCGATGA CAGTAAGAG 3050
 ATTATCAGT CCGTCCATA CCATGATGA TAACTAGG CCAACTTAC 3100
 TTCTGACAC GATCGAGGA CCGAAGGAG TAAAGCTTT TTTGACAA 3150
 ATGCGGATC ATGTAACTG CTTGATGCT TGGGAAGCG AGCTGAATG 3200
 AGCCATACA AACGAGAGC GTGACACAC GATCGAGCA GCAATGCAA 3250
 CAAGCTTGG CAACATTA ACTGGGAAC TACTTACTT AGCTTCCCG 3300
 CAACAATTA TAGACTGAT CGAGCGGAT AAGCTTCAG GACCACTTC 3350
 GCGCTGGCG CTTGGGCTG CCGGTTTAT TCGTGATAA TCTGAGCGC 3400

GCGAAGCAG CAGCGAGC GAGTCACTG CCGAGAACG GGAAGCGCG 4300
 CCAATACCA AACGCGCTT CCGCGCGGT TGGCGATTC ATTAATCGA 4350
 CTGCGACAG AGTTTCCCG ACTGGAAAG CCGCACTGAG CCGAACCAA 4400
 TTAATGTAG TTAAGTACT CATTAGGAC CCGAGCTTT ACATTTATG 4450
 CTTGGGCTC GTATGTTTG TCGAATGTC AGCGATAAC AATTTCACG 4500
 AGGAAGCAG TATGACATG ATTACGAAT AA 4732

(2) 配列番号2の情報:

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 47
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号2:

TTGGAATCC ATTACAAAC TCGACTGTT TGTGTTGGC ACAAGAT 47

(2) 配列番号3の情報:

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 30
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号3:

GAAATCCAT TACGAGTCC AATTGTTTC 30

(2) 配列番号4の情報:

GTGAGGTGG GTCTGGGCT ATCATTCAG CACTGGCGC AGATCTAAG 3450
 CCTTCGCTA TGTAGTTAT CTACAGAGC GCGATCAGC CAATATGGA 3500
 TGAAGAAAT AGACAGATG CTGATAGG TCGTCACTG ATTAAGCAT 3550
 GGTAACTGC AGACAGATT TACTCATTA TACTTATAT TGAATTAAG 3600
 CTTCATTTT AATTAAAGG GATCTAGTG AAGTCTCTT TGTATAAT 3650
 CATCAAAA ATCGTTAAC GTGATTTTC GTTCACTGA CCGTCAAGC 3700
 CCGTAGAAA GATCAAGGA TCTTCTGAG ATCGTTTTT TCTGGGCTA 3750
 ATCTGCTCT TCGAAGCAA AAGACCGC CTAGCAGCG TCGTTGTTT 3800
 GCGGATCAA GAGTACCAA CTTCTTTTC GAAGTTACT GCGTCAAGC 3850
 GCGGCAGAT ACAAATACT GTCTTTTAC TGTAGCGTA GTTAGCGAC 3900
 CACTCAAGA ACTCTTAGC ACGCTCAGA TACCTGCTG TCGTAATCT 3950
 GTTACAGTG CCGTCTCCA GTGGGATTA GTCTGCTTT ACGGTTTGG 4000
 ACTCAAGAG ATAGTTACG GATAAGCGC ACGCTGGCG CTGAAGCGC 4050
 GGTGCTGCA CAGAGCGAG CTGAGAGCA ACGCTCAGA CCGACTGAG 4100
 ATACTACAG CCGTCACTT GAGAAAGCG CAGCTTTTC GAAGGAGGA 4150
 AGCGGACAG GTATGGGTA ACGGCGCGG TCGAAGAGG AGAGCGCAG 4200
 AGGAGCTTC CAGCGGAAA CCGCTGCTT CTTTATAGT CTGCTGGTT 4250
 TCGGAGCTC TCACTTGGC GTGATTTTT GTGATCTCG TCGAGGCGG 4300
 GGAAGCTAT GAAAGAGCG ACGAGCGCG CTTTTTAGG GTTCTGGCG 4350
 TTTGCTGGC CTTTCTCTA CATCTCTTT CCGCTTTAT CCGCTGATC 4400
 TGTGATAGC CTTATACCG CTTTGAAGT ACGTATAC CCGTGGGCA 4450

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 26
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号4:

CCCATTTACA ACTGCAATT GTTTGG 26

(2) 配列番号5の情報:

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 22
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号5:

AGAAGGAAA CAGTGTCTG CA 22

(2) 配列番号6の情報:

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 22
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号6:

AGTGGGCGC CAGAACTCC CT 22

(2) 配列番号7の情報:

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 23
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (xi) 配列: 配列番号7:

TCACGACCA GCACAAATGA CAC 23

(2) 配列番号8の情報:

- (i) 配列の特徴
 (A) 長さ: 30
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (xi) 配列: 配列番号8:

GCATTAACCT TCTGAGTTTC TAATGTAGTC 30

(2) 配列番号9の情報:

- (i) 配列の特徴
 (A) 長さ: 30
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (xi) 配列: 配列番号9:

CATAGTATTG TCAAGCTTCAA CTCTGAAACA 30

(2) 配列番号10の情報:

- (i) 配列の特徴
 (A) 長さ: 30

- (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (xi) 配列: 配列番号13:

TTGTCCATGT GATTAATCAC AGT 23

(2) 配列番号14の情報:

- (i) 配列の特徴
 (A) 長さ: 35
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (xi) 配列: 配列番号14:

GTTGGTGTTC GGATGCCATT TACCTATCCG AATTG 35

- (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (xi) 配列: 配列番号10:

TCATGTGAC ATATCTTCAG TTGTTTCGAA 30

(2) 配列番号11の情報:

- (i) 配列の特徴
 (A) 長さ: 30
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (xi) 配列: 配列番号11:

TGTGGTATCA CCTTCATCTT GTCCATGTGA 30

(2) 配列番号12の情報:

- (i) 配列の特徴
 (A) 長さ: 24
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (xi) 配列: 配列番号12:

ACCTTGGATG CATTAGTTTG TTTC 24

(2) 配列番号13の情報:

- (i) 配列の特徴
 (A) 長さ: 23
 (B) 型: 核酸

(2) 配列番号15の情報:

- (i) 配列の特徴
 (A) 長さ: 10596
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (xi) 配列: 配列番号15:

TTGAGCTCG CCGACATTC ATTATTGACT AGTTATTAACT ACTAATCAAT 50
 TACGGGGTCA TTAGTTTATA GGCATATAT GAGTTTGGC GTTACATAAC 100
 TTACGGTAA TGGGGGGCT GCGTGAAGC CCAACGAACC CCGGGCATTC 150
 ACGTCAATAA TGAAGTATGT TCCATAGTA AGGCCAATG GCACTTTGCA 200
 TTGAGCTCAA TGGGTGGAGT ATTTACGGTA AACTGGGAC TTGGCAGTAC 250
 ATCAAGTGA TCATATGCA ACTAGGGGCT CTATTAGGT CAATGACGGT 300
 AAATGGGGG CCGGCAATTA TGGCAGTAC ATGACCTTAT GCGACTTTGC 350
 TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACG ATGGTGATGC 400
 GCTTTTGCCA GTACATCAAT GCGGGTGGT AGCGTTTGA CTCACGGGCA 450
 TTTCGAAGTC TCCAGCCCAT TGACGTCAA? GCGAGTTTGT TTGGGACCA 500
 AAATCAAGCG GACTTTCCAA AATGTCTTAA CAACTGGGCT CCAATGACGC 550
 AAATGGGGG TAGGGTGTG CCGTGGCAGG TCTATATAAG CAGAGCTCGT 600
 TTAGTGAAAC CTCAGATGCT CTGGAGACGC CATCCAGCT GTTTTGACCT 650
 CCAATAGAGA CAGGGGACC GATCCAGCT CCGGGGGGGG GAAAGGTGCA 700
 TTGGAAGCGG GATTCGGGCT GCAAGAGTG ACCTAAGTAC GCGCTATAGA 750

GCTATAGGC CCAOCCCTT GGCCTGTTA GAACGGGGT ACAATTAATA 800
 CATAACCTTA TGATATATC ACATACGATT TAGGTGACAC TATAGATAA 850
 CATOCACITT GGCCTTCTCT CCACAGGTCT CCACTCCAC GTCCAACTGC 900
 AACTGGGTC TATCGATTCT CGAGATTAA TTCAAGCTTC GGGGGCAGC 950
 TTGGCCGCA TGGCCAACT TGTATTTC AGCTTATAAT GTTTACAAT 1000
 AAAGCAATAG CATCAAAAT TTCAAAATA AACATTTTT TTCACTGCAT 1050
 TCTAGTTCTG GTTTGTGCA ACTCATCAAT GTAJCTTATC ATCTCTGGAT 1100
 CGATGGGAA TTAATGGGC CAGACCAAT GGCCTGAAAT AACCTCTGAA 1150
 AGAGGAACCT GGTAACTTAC CTCTGAGGC GGAAGAAAC AGCTCTGAA 1200
 TGTGTGAC TTAGGTGTC GAAAGTCCC AGCTCCCA CCAAGCAGAA 1250
 GTATCAAG CATCATCTC AATTAGTCAG CAACAGGTC TGGAACTGC 1300
 CCAGGCTCC CAGCAGGCA AAGTATGCA AGCATCATC TCAATTAGTC 1350
 AGCAACATA GTCCGCCGC TAACCTGCC CATCCGCC CTAACCTGC 1400
 CCAGTTCCGC CCATCTCCG CCCCAGGCT GACTAATTT TTTTATTAT 1450
 CCAGAGGCG AGCGGCTC GGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAG 1500
 AGCCTTTTT GAGGCTTAG GCTTTTCAA AAAGCTCTC AGCTGATGA 1550
 TTCTCATTT TGACAGCTTA TCATCGATAG ATCTCAGAG GGGGACCCA 1600
 CCTTTCTTC CATTGCCCA GTACATCTC TGTCTGTTGA CCTTGAAGAG 1650
 GAAGAGGAG GGTCCGAGA ATCCCATCC CTACCTCCA CCAAAAGGC 1700
 GGACGAGAA TTTGAGGCT GCTTGAGGC TCAGGAGCA AATCTTGAG 1750
 ATGTCAGGC GAGTTTTCC GGGCTGGAG TAATTGTTGA TGAGGAGAG 1800

AGCAGAGGC CCACGAGGC CAGGAGAGC AGGGCAGGA GGGCAGGAG 2900
 CAGGAGAGC CCACGAGCA GAGGAGGAG GAGCAGGAG TGGAGGAG 2950
 GGTGAGGAG CAGCTGAGC CCGGCTGCA GAGGATAGT GAGGCGGAG 3000
 TCGAGGAGT AGTGAGGCG CCGGCTAG AGGAGTGA AGAGGAGGC 3050
 GGGGAGGTC TGAAGAGGC AGGGGAGAG GTGCTGAGC TCGAGAGAG 3100
 AGGGCAGGA GTCCAGTAG TCAGTCATCA TCATCCGGT CTCCACCCG 3150
 CAGGCGGCT CCAGTAGAA GGCATTTTT CCACCTCTA GGGGAGGCG 3200
 ATTATTTGA ATACCACCA GAAGCTGCC CAGATGTTGA GCTGAGCTG 3250
 CCGGCGGAG CCATAGACA CCGGCGCA GATGAGGAG GAGAGGCG 3300
 AAGCACTGA CCGGCGGTC AGGCTGAGC AGGAGGCGC AAGAGAGAG 3350
 GGTGTTTTG AAAGCATCT GTTCAAGAG GTTCCAGGC GAAATTTGAG 3400
 AACATTGAG AAGCTTAA AGCTCTCTG CTAGGAGCT ACCTAGAGAG 3450
 GACTACGAG GAAGGAACCT GGTGCGGCG TGTCTCTTA TATGAGGTA 3500
 GTAAGAGCT CCTTTACAC CTAAGGAGG GAAGTGGCT TCTATTCCA 3550
 CAATGCTGC TTACCAATT GACTGCTCT CCGTTTGA TGGCGGCTG 3600
 ACCCGGCCA CAACCTGCC CCGTAAGGA GTCCATTCT TGTATTICA 3650
 TGGCTTTTT ACAACCTAT ATATTCTCT AGTTTTGA AGATGCGAT 3700
 AAGGAGCTG TTATGACA GCGGCTCTC AGCTGCAATA TCAGGCTGAC 3750
 TGTGTGAGC TTGAGGATG GAGTAGATT GCTCCCTGC TTCCACCTA 3800
 TGGTGAAGC GCTGCGGCG GAGGCTGAT ACGGAGATGA CCGAGATGA 3850
 GAGGCTGAT GAGATAGC TCAGGAGGC CAGGAGTAT GTACTTCTT 3900

GATGCTTCC AGATGAGCA ATTTTACAC CTGATCTCT CTGACAGCA 1850
 CCATCAAGC GATGAGGTC GGGGCTCTT TGGAGGCGC AGGAGCTGC 1900
 ACTGCTCTA TTCACTGAG CTGCTTAAT AAAGATCTCT ATTGATCTCT 1950
 TTTAGTCTGA ATCATGCTG AGAGGAGGC AGTACAGCA OCTGAGATG 2000
 GCTAGGAGA CAGGAGGAG ACATCTGAG CAGAGGCTC CCGGCGAGT 2050
 GGAOCTCAA CAGAGGCGC TGATTAOAT GAGAGGAGC GGGGAGAG 2100
 AGAGGAGCA CAGGAGGAA CAGGAGGAG CCGGCGGCG TCAGGATCAG 2150
 GGGGAGAGA TAGGATGCT CTGCGAGAC CCGGAGAGC TCGAGTTC 2200
 ATTGCTTCA AAGGAGCA CCGTGAACA GAGGAGGAG CAGGAGGAG 2250
 AGGGGAGCA CAGGAGGAG CAGGAGGAG AGGAGGCGC CAGGAGGAG 2300
 GAGGAGGAG AGGGGAGCA CCGGAGGAG GGGGAGGAG AGGAGGAG 2350
 CAGGAGGAG CAGGAGGAG AGGAGGCGC AGGAGGCGC CAGGAGGAG 2400
 AGGGGAGCA CAGGAGGAG GGGGAGGAG CCGGAGGAG CAGGAGGAG 2450
 CAGGAGGAG AGGAGGCGC CAGGAGGAG CAGGAGGAG AGGAGGAG 2500
 GGGGAGGAG CCGGAGGAG AGGAGGAG CCGGAGGAG CAGGAGGAG 2550
 AGGAGGAG CCGGAGGAG CAGGAGGAG CCGGAGGAG CAGGAGGAG 2600
 CAGGAGGAG AGGGGAGCA CAGGAGGAG GGGGAGGAG CCGGAGGAG 2650
 CAGGAGGAG CAGGAGGAG AGGAGGAG CAGGAGGAG GAGGAGGAG 2700
 AGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG AGGGGAGCA GGGGAGGAG 2750
 CAGGAGGAG AGGAGGCGC GAGGAGGAG GAGGAGGAG AGGGGAGCA 2800
 CAGGAGGAG GGGGAGGAG CCGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG 2850

AGGAGAGGC CTCAATCTA TTAAGGCGC TGTATTGCC CCACTAAG 3950
 AATAATGCC CACTACAT CATGCTGCT GTTGTGTAT TTCTGCGAT 4000
 CTGCTTCTC ACATTTTCC TCTTCCAC ATGGGCAAT TGGGATAGC 4050
 CATGTTCTA CGTCACTCAG CTCCGCGTC AACCTTCT CCGTTTGA 4100
 AACATTAGC ACATTTAGT GTTCAOAT CAGATAGC ACGCTTTAG 4150
 CTGCGCTCC TTAATTAC CTAAGATGC GAGGAGGAG CATGAGGAA 4200
 AAGGAGAGC AGGAGGAT CAGGCGGCT TGGAGGTC CCGCATATC 4250
 AAGGATAGC ACTGCGCTC TACTAGGCT TATCATATC TGACTGATA 4300
 TCGATAGGA TAGCATATC TACCGGATA CAGATTAGA TAGCATATC 4350
 TACCGAGTA TAGATTAGA TAGCATATC TACCGAGTA TAGATTAGA 4400
 TAGCATATC TACCGAGTA TAGATTAGA TAGCATATC TACCGAGTA 4450
 TAGATTAGA TAGCATATC TACCGAGTA TAGATTAGA TAGCATATC 4500
 TACCGAGTA TAGATTAGA TAGCATATC TACCGAGTA TAGATTAGA 4550
 TAGCATATC TACCGAGTA TAGATTAGA TAGCATATC TAGATTAGA 4600
 TAGCATATC TAGATTAGA TAGATTAGA TAGCATATC TAGATTAGA 4650
 TAGCATATC TAGATTAGA TAGATTAGA TAGCATATC TAGATTAGA 4700
 TAGCATATC TAGATTAGA TAGATTAGA TAGCATATC TAGATTAGA 4750
 TAGCATATC TAGATTAGA TAGATTAGA TAGCATATC TAGATTAGA 4800
 TAGCATATC TAGATTAGA TAGATTAGA TAGCATATC TAGATTAGA 4850
 TAGCATATC TAGATTAGA TAGATTAGA TAGCATATC TAGATTAGA 4900
 CCGGCGGCT TCTGAGGAG CTGTTGAATA TGAGGAGCA CAACCTCTC 4950

CTTGCCCTC AGGCGAAGT GTGTGTAAT TTCTCTCAG ATGCGAGAA 5000
 TGGGCCCCCT ATCTTGCCG GCGCACTAC TTATCGAGGT ATTGCCCCGG 5050
 GTGCCATTAG TGGTTTGTG GCGAAGTGG TTGACGCGAG TGGTTAGGGG 5100
 GGTACAATC AGCGAAGTTA TTACACCCCT ATTTTACAGT CCAAAAGCG 5150
 AGGCGCCCT GTGGGGCTG ACCGCTGCC CCACTGCACA ATTTCAAAA 5200
 AAGAGCTGC CACTTGTCT TGTATTGGG CCGCATTGG GTGGAGGCC 5250
 GTTTAATTT CGGGGGTGT AGAGACAAC AGTGGAGTC GCTGCTGTG 5300
 GCGTCCACT TCTTTCCCT TGTACAAT AGAGTGTAC AACATGCTT 5350
 ACCGTCTTG GTCCCTGCT GCGACACAT TTAATAAGC CAGTATCAT 5400
 TTGACTAGG ATATGTGTG GCGCATGCC ATAAATTCG GTGAGTGG 5450
 CATCCAGCT TTACGCTTG TCCCAAGCC ATGCAATTCT ATTTTAAAG 5500
 ATATTAGAA TGTTCATC CTACACTAG ATTTATTGC CAGGGCTTT 5550
 GTGAGGTTA TATTGTGTC ATAGCAAT GCGACACTG AACCCCGCT 5600
 CCAATTTTA TTCTGGGGC GTCACTGAA ACCTTCTTT CAGCACTGC 5650
 ACATACACT TACTGTCAC AACTCAGAG TTATTCTAT AGCTAAAG 5700
 AGGAGATGA AGAGCAGGC GAAGATTGAG GAGAGTTAC TCGCCCTCC 5750
 TTGATCTTA GCGACTGCC TTGACTGAA AATGCTTAC TACCTCGTG 5800
 GATGCTGAC CCATGTAAA TAAAGCCGC ACAGCTCAT GGGTGGAGA 5850
 TATGCTGTT CTTAGGACC CTTTACTAA CCTAATTCG ATAGCATATG 5900
 CTTCCGCTG GGTAAATAT GCTATTGAT TAGGCTTAGT CTGATAGTA 5950
 TATACTACTA CCGGGAAGC ATATGCTAC CGTTAGGGT TAACAAGGG 6000

CGGAAGCCA ACCTTTCATA GAAGCGCGG GTGGAATGGA AATCTGTGA 7100
 TGGCAGGTT GCGCTGCTT GGTGGTCAAT TTGGAAGCC AGAGTCCGC 7150
 TCAGAGAAC TGTCAAGAA GCGGATGAA GCGATGCCG TCGGAATCG 7200
 GAGGGGGAT ACCGTAAAG AGGAGAGC GGTCAAGCCA TTGCGGCCA 7250
 AGCTCTTCA CAATATCAC GGTAGCCAC GCTATGCTT GATAGGGTC 7300
 CCGCACACC AGCGGCCAC AGTCGATGA TCGAAGAAAG CCGCATTTT 7350
 CCACATCAT ATTCGCAAG CAGGATGCC CAGGCTGAC GAGGAGATC 7400
 TCGCCCTGG GATCGGCCG CTGAGCGTG CGGAACAGT GCGCTGGCG 7450
 GAGCCCTGA TGTCTCTGT CCAGATCAT CTGATGACA AGAGCGCTT 7500
 CCATCCGAGT AGTCTGCGG TCGATGCGT CTTTCTCTG GTCGTGAA 7550
 GCGAGGTAG CCGATCAAG CGTATGAGC CCGCGATTG CATCAGCAT 7600
 GATGATACT TTCTGGCAG GAGCAAGTG AGATGACAG AGATCTGCC 7650
 CCGCACTTC CCGCAATAG AGCGAGTCC TTCCGCTTC AGTGACAAG 7700
 TCGAGCAGC GTGGCAAGC AACCGCCCT GTGCGAGCC AGCATAGCC 7750
 CCGTGCCTG TGTGCGAGT CATTCAGGC AGCGGACAG TCGCTCTGA 7800
 CAAAGAAGC CGGGCGGCC TCGCTGACA GCGGAACAC GCGCGATCA 7850
 GAGCAAGCA TTCTCTGTT TCGCGAGTA TAGCGAATA CCGTCTCAC 7900
 CCAAGCGGC GGAAGACGT CCGCAATCC ATCTTGTCA ATCATGCGA 7950
 AGGATGCTA TCGTCTCTT TGAATGATC TCGGACAGC TGTTCAGCT 8000
 GTTAAAGGG TCGCTCAGG GTCGCTGCT GTTCAGGCC ACAAGCTCA 8050
 CTTAATATG CGAAGTGCAC CTGGAGGCC GCGCGCCGA CTGATCTGC 8100

CGCTTATAA CACTATTCT AATGCCCTT TGAAGGTCG CTATCGGTA 6050
 GCTACACAG CCGCTCTAT TGAAGTGGT GTAGCGTCC GTAGCTTCC 6100
 TGGGCGCGT GAGGTACAT GTCCCGCAG ATTGCTGTA GAGCTTCAG 6150
 CAGAGTTAC ACATAAAGC AATGTTGTT TCGACTCAC AGACTGAAA 6200
 GTCTCTGCA GATGAAAGC CACTCACTT TCGCAATCT GAGATCAT 6250
 TTATAAGAT GTCAACTACA GTGAGAGAC CCGTTTCTT TTGCTGCC 6300
 CCGCTCTAC ATGTGGAAC GCGCGACTT GCGAAGTGT ACAAAGAAC 6350
 TGAAGGATT ACATGACTG CCGCTGACA ATACAAACA AAGCGCTCC 6400
 TCGTAAGCC GAAGAAGGC CAGAGTGGC GTAGTCAGT TTAGTGGTC 6450
 CCGCGCGGG GATGCGCCA GAATGCGG CCGTGGTCT TGGGGTGG 6500
 CCGTCTTTC CAGCCACAG CCGCGCTCT TCGCTGCCG CCGTACATG 6550
 CCGTCCATC CAGCGCATC CAAAGACAT CCGCTCTCT CCGTCTGCA 6600
 GTCTGAGC TGAAGCAGC CAGCGGCCA AAGATTAAC CCGAGAAC 6650
 ATAAAGATT CCGCATGCG GAGCGCTTC CTAAGCAGC GCGCGCTGG 6700
 CTAGCGCGC CTGCGGCCG CAGCTTGGC TCGAGGCTT GCGCTTAC 6750
 CCGACTTGG GCGTGGCTT GCGGAAGAG AAGAAAGCC GCGCTATTG 6800
 CCGCAATGG GTCTGCTGG CGTATGACA GATGCGCAG CCGTGGAGC 6850
 AACCGCGCT TTATGAACA ACGAGAAC CCGCGCTT TTATTCTCT 6900
 CTTTTATTG CCGTCAAGC CCGGCTTCT TCGGTTATG TCTCTTGG 6950
 TGTTCAGTT AGCTGCGCC ATCTGCGGG GTGCGGAGC AACTCAGCA 7000
 TGAGATGCC GCGTGGAGC ATCATGACC CCGCGTCCG GAAGAAGT 7050

GTCTGGAAT TCATCAAGC AACATAGTA CCGCGCTCT AGCGCGCAT 8150
 TAAAGCGGC GCGTGTGTT GTTACGCGA CCGTGGCCG TACACTGCC 8200
 AGCGCGTAG CCGCGCTCC TTGCGCTTC TTGCTTCTT TTCTGCGAC 8250
 GTTCGCGGC TTTCGCGTC AACCTGAAA TCGCGGCTC CTTTAAAGT 8300
 TCGGATTAG TCGTTAGCG CAGCTGAGC CCAAAAGCT TGAATTGCT 8350
 GATGCTTAC GTAGTGGCC ATGCGCTGA TAGAGGTTT TTGCGCTTT 8400
 GAGCTTGGC TCGAGCTCT TTAATAGTG ACTCTGTC CAACTGGA 8450
 CAACACTCA CCGATCTCG GCGATTCTT TTGATTATA AGCGATTTC 8500
 CCGATTGCG CCGATTGCTT AAAAAAGC CTGATTAGC AAAAAATTA 8550
 CCGGAATTT AACAAATAT TAAGCTTAC AATTATAGC TCGAGGCTC 8600
 GTGATAGCC TATTTTATA CCGTAATGC ATGATAATA TCGTTCTTA 8650
 GAGCTCAGT CCGCTTTC GCGGAATGT CCGCGAGC CCGATTGTT 8700
 TATTTTCTA AATACATCA AATATGATC CCGCTAGC ACAATAAGC 8750
 TGATAAATC TTCAATAATA TGAAGAGC AAGATGTA GTATTCAAC 8800
 TTCCGCTGC CCGTTATTC CCGTTTTC CCGATTTC CCGCTGTT 8850
 TTGCTAGC AGAAGCGCT GTGAAGTA AAGATGTA AGATGCTG 8900
 GGTGACGAG TGGTTACAT CGAATGAT CTCACAGC GTAAGATCT 8950
 TGAGAGTTT CCGCGGAG AACGTTTT CCGATGAGC ACTTTAAG 9000
 TTCTCTATG TCGCGGCTA TTATCCGCT ATGAGCGGC CCAAGAGCA 9050
 CTGCGTCCG GCATACACTA TTCTCAGAT GACTGCTTC ACTACTCAC 9100
 AGTCACAGA AAGATCTTA CCGATGAT CAGATAGA CAATTATGA 9150

特表平7-508420 (20)

GTGCTGCAT AACCATGAGT GATAACACTG CGGCAACTT ACITCTGACA 9200
 ACGATCGGAG GACCGAAGGA GCTAACCGCT TTTTTCACCA ACATGCGGGA 9250
 TCACTGAAT CGCCTTGATC GTTGGGAACC GGAAGTGAAT GAAGCAATAC 9300
 CAAACGAAGA GCGTGACAGC ACGATGCCAG CAGCAATGCC AACAAAGTTG 9350
 CGCAAACTAT TAACTGGGA ACTACTTACT CTAGCTTCCG GGCACAAATT 9400
 AATAGACTCG ATCGAGCGCG ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG 9450
 CCGTTCGCGC TGCGCTGTTT ATTCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT 9500
 GCGTCTCGCG GTATCATTCG AGCACTGGCG CGACATGCTA AGCGCTCGCG 9550
 TATCTGAGTT ATCTACAGGA CGGGAGTCA GGCACATATG GATGAACGAA 9600
 ATAGACAGAT CGCTGAGATA GGTGCGTCACT TGATTAAGCA TTGCTAACTG 9650
 TCAGACCAAG TTTACTCATA TATACTTAG ATTGATTAA AACTTCATT 9700
 TTAATTAAAG ACGATCTAGG TGAGATGCTT TTTGATAAT CTCATGACCA 9750
 AAATGCGTTA ACGTGAGTTT TGCTTCACT GAGCGTCAGA CCGGCTAGAA 9800
 AAGATCAAG GATCTTCTTG AGATCGTTT TTTCTGCGCG TAACTGCTG 9850
 CTTCAGAGA AAAAAACAC CGCTACGAGC GGTGGTTTGT TTGCGGATC 9900
 AAGAGCTACC AACTCTTTT CCGAAGCTAA CTGCGTTCAG CAGAGCGCAG 9950
 ATACCAATA CTGCTCTCT AGTGAGCGCG TAGTTAGCGC AGCACTTCAA 10000
 GAACCTCTGA GCACCGCTTA CATACCTCCG TCTGCTAATC CTGTTACGAG 10050
 TGCTCTGCG CAGTGGGAGT AAGTCTGCT TTACCGGCTT GCACTCAAGA 10100
 CGATAGTTAC CGGATAAGG CGAGCGGTCG GCGTGAAGG GCGCTTCCTG 10150
 CACACAGCGC AGCTTGAGC GAACGACCTA CACCGAACTG AGATACTAC 10200

CACTAGTTAG GATGCGGAC ATGCTCTCA CAGGATCTG CACTGTCG 50
 CATGAA 56

(2) 配列番号18の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 22
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号18:

TAGTACTAC ACTATGATCT CT 22

(2) 配列番号19の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 22
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号19:

JTTACTTCTT GACGCTOCAG AG 22

(2) 配列番号20の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 25
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直線状

AGCGTAGCA TTGAGAAAGC GGCACGCTTC CCGAGCGAG AAGGCGGAC 10250
 ACGTATCGCG TAAAGCGCAG GGTGCGTACA GCGACGCGCA CGAGCGAGCT 10300
 TCGAGCGGGA AACGCGTGT ATCTTATAG TCGTCTCGCG TTTGCGCAGC 10350
 TCTGACTTGA GGTGCGATT TTTGATGCT GGTGAGGCG GCGGAGCTTA 10400
 TCGAAAGAG CCACTGCGCA GCGAGGCTT CCGACTGCA AAGCGCGCAG 10450
 TCGCGCGAC GCAATTATG TGAGTTACCT CACTCATTAG GCACCGCAGC 10500
 CTTTACACTT TATGCTTCCG GCTGCTATGT TGTGCGGAT TGTGAGCGA 10550
 TACCAATTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACC AATTAA 10596

(2) 配列番号16の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 51
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号16:

ATGAAGGCGC CCGCTGCTCT TCGACCTGCG ATGCTGCTGC TCGTGTTCAC 50

C 51

(2) 配列番号17の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 56
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号17:

(xi) 配列: 配列番号20:

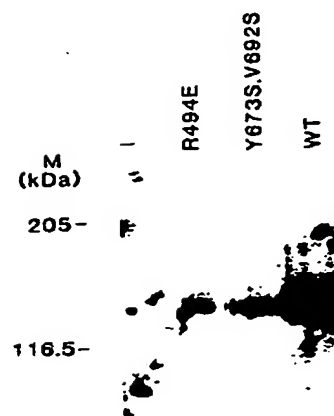
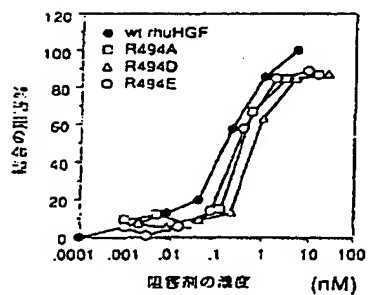
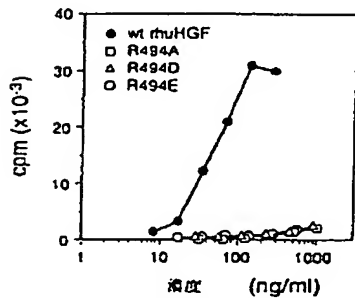
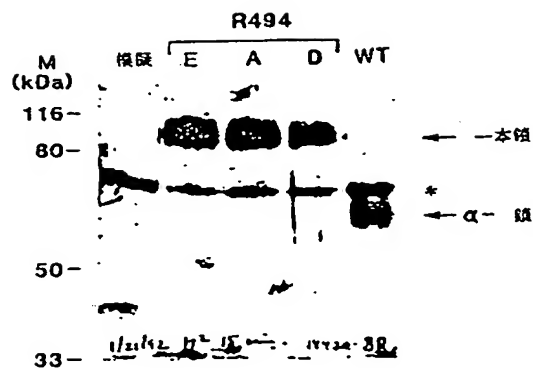
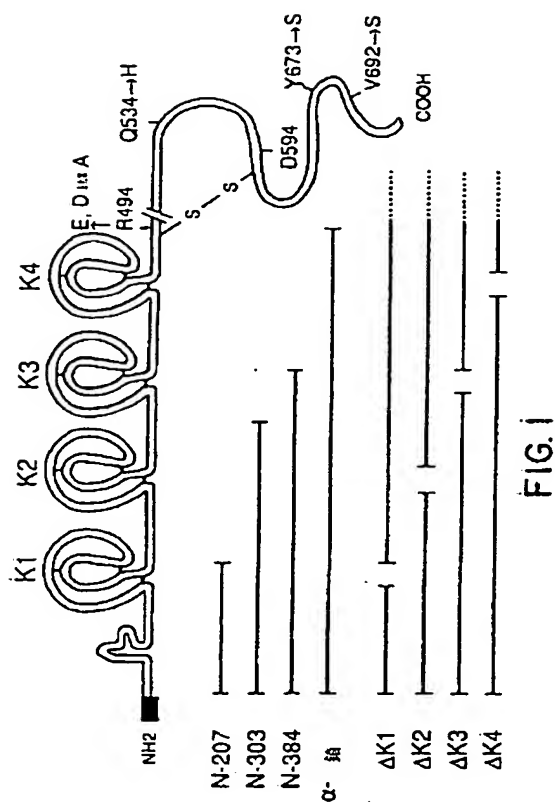
CAGCGGAGT TGCAGATTCA GCTGT 25

(2) 配列番号21の情報:

- (1) 配列の特徴
 (A) 長さ: 45
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: 配列番号21:

AGTTTCTCG GTGACCTGAT CATTCTGATC TGCTTGAAC ATTAC 45



BEST AVAILABLE COPY

GCTACCAGCG
 GTGGTTTGTGTT TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTC CGAAGGTAAC
 TGGCTTCAGC
 AGAGCGCAGA TACCAATATC TGTCCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA
 CCACTTCAGG
 AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCCAGT
 GGCTGCTGCC
 AGTGGCGATA AGTCTGTCTT TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC
 GGATAAGGCG
 CAGCGGTGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCC
 AACGACCTAC
 ACCGAACCTGA GATACCTACA GCGTGAGCAT TGAGAAAGCG CCACGCTTCC
 CGAAGGGAGA
 AAGCGGACA GGTATCCGCT AAGCGGCAGG GTCCGAACAG GAGAGCGCAC
 GAGGAGGCTT
 CCAGGGGGAA ACGCCTGCTA TCTTTATAGT CCTGTCGGCT TTGCGCACTT
 CTGACTTGAG
 CGTCGATTTT TGTGATGCTC CTCAGGGGGG CGGAGCCCAT GGAAAAACGC CAG

>< P V U >

< 変換規則により導出された PvuII 部位: 削除された 22bp PvuII 断片 >

< P K S の 4522 の PvuII に結合 >

CTGGCAGCAGAGTTTCCCGA

CTGAAAGCGGGCAGTGACCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACCTCACTCAITAGGCACC
 CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCGGGCTGCTATGTTGTGTGGAATTTGAGCGGGATAACA
 ATTTACACAGCAACAGCTATGACCAATGATTAC
 GAATTA

FIG. 6F

国際調査報告

PCT/US 93/04648

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Classification No.	
Inventor or Inventors' Name (Classification IPC) or Invention Classification No. (IPC)		A61K37/02	
Int. Cl. 5 C12N15/19;		C07K13/00;	
2. FIELD OF SEARCH			
Inventor's Classification No.		Classification No.	
Int. Cl. 5		C07K : C12N : A61K	
3. DISCLOSURE SUMMARY			
4. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
5. CLAIMS			
6. ABSTRACT			
7. CITATIONS			
8. OTHER INFORMATION			
9. SUMMARY OF THE INVENTION			
10. SUMMARY OF THE INVENTION			
11. SUMMARY OF THE INVENTION			
12. SUMMARY OF THE INVENTION			
13. SUMMARY OF THE INVENTION			
14. SUMMARY OF THE INVENTION			
15. SUMMARY OF THE INVENTION			
16. SUMMARY OF THE INVENTION			
17. SUMMARY OF THE INVENTION			
18. SUMMARY OF THE INVENTION			
19. SUMMARY OF THE INVENTION			
20. SUMMARY OF THE INVENTION			
21. SUMMARY OF THE INVENTION			
22. SUMMARY OF THE INVENTION			
23. SUMMARY OF THE INVENTION			
24. SUMMARY OF THE INVENTION			
25. SUMMARY OF THE INVENTION			
26. SUMMARY OF THE INVENTION			
27. SUMMARY OF THE INVENTION			
28. SUMMARY OF THE INVENTION			
29. SUMMARY OF THE INVENTION			
30. SUMMARY OF THE INVENTION			
31. SUMMARY OF THE INVENTION			
32. SUMMARY OF THE INVENTION			
33. SUMMARY OF THE INVENTION			
34. SUMMARY OF THE INVENTION			
35. SUMMARY OF THE INVENTION			
36. SUMMARY OF THE INVENTION			
37. SUMMARY OF THE INVENTION			
38. SUMMARY OF THE INVENTION			
39. SUMMARY OF THE INVENTION			
40. SUMMARY OF THE INVENTION			
41. SUMMARY OF THE INVENTION			
42. SUMMARY OF THE INVENTION			
43. SUMMARY OF THE INVENTION			
44. SUMMARY OF THE INVENTION			
45. SUMMARY OF THE INVENTION			
46. SUMMARY OF THE INVENTION			
47. SUMMARY OF THE INVENTION			
48. SUMMARY OF THE INVENTION			
49. SUMMARY OF THE INVENTION			
50. SUMMARY OF THE INVENTION			
51. SUMMARY OF THE INVENTION			
52. SUMMARY OF THE INVENTION			
53. SUMMARY OF THE INVENTION			
54. SUMMARY OF THE INVENTION			
55. SUMMARY OF THE INVENTION			
56. SUMMARY OF THE INVENTION			
57. SUMMARY OF THE INVENTION			
58. SUMMARY OF THE INVENTION			
59. SUMMARY OF THE INVENTION			
60. SUMMARY OF THE INVENTION			
61. SUMMARY OF THE INVENTION			
62. SUMMARY OF THE INVENTION			
63. SUMMARY OF THE INVENTION			
64. SUMMARY OF THE INVENTION			
65. SUMMARY OF THE INVENTION			
66. SUMMARY OF THE INVENTION			
67. SUMMARY OF THE INVENTION			
68. SUMMARY OF THE INVENTION			
69. SUMMARY OF THE INVENTION			
70. SUMMARY OF THE INVENTION			
71. SUMMARY OF THE INVENTION			
72. SUMMARY OF THE INVENTION			
73. SUMMARY OF THE INVENTION			
74. SUMMARY OF THE INVENTION			
75. SUMMARY OF THE INVENTION			
76. SUMMARY OF THE INVENTION			
77. SUMMARY OF THE INVENTION			
78. SUMMARY OF THE INVENTION			
79. SUMMARY OF THE INVENTION			
80. SUMMARY OF THE INVENTION			
81. SUMMARY OF THE INVENTION			
82. SUMMARY OF THE INVENTION			
83. SUMMARY OF THE INVENTION			
84. SUMMARY OF THE INVENTION			
85. SUMMARY OF THE INVENTION			
86. SUMMARY OF THE INVENTION			
87. SUMMARY OF THE INVENTION			
88. SUMMARY OF THE INVENTION			
89. SUMMARY OF THE INVENTION			
90. SUMMARY OF THE INVENTION			
91. SUMMARY OF THE INVENTION			
92. SUMMARY OF THE INVENTION			
93. SUMMARY OF THE INVENTION			
94. SUMMARY OF THE INVENTION			
95. SUMMARY OF THE INVENTION			
96. SUMMARY OF THE INVENTION			
97. SUMMARY OF THE INVENTION			
98. SUMMARY OF THE INVENTION			
99. SUMMARY OF THE INVENTION			
100. SUMMARY OF THE INVENTION			

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Classification No.	
Inventor or Inventors' Name (Classification IPC) or Invention Classification No. (IPC)		A61K37/02	
Int. Cl. 5 C12N15/19;		C07K13/00;	
2. FIELD OF SEARCH			
Inventor's Classification No.		Classification No.	
Int. Cl. 5		C07K : C12N : A61K	
3. DISCLOSURE SUMMARY			
4. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
5. CLAIMS			
6. ABSTRACT			
7. CITATIONS			
8. OTHER INFORMATION			
9. SUMMARY OF THE INVENTION			
10. SUMMARY OF THE INVENTION			
11. SUMMARY OF THE INVENTION			
12. SUMMARY OF THE INVENTION			
13. SUMMARY OF THE INVENTION			
14. SUMMARY OF THE INVENTION			
15. SUMMARY OF THE INVENTION			
16. SUMMARY OF THE INVENTION			
17. SUMMARY OF THE INVENTION			
18. SUMMARY OF THE INVENTION			
19. SUMMARY OF THE INVENTION			
20. SUMMARY OF THE INVENTION			
21. SUMMARY OF THE INVENTION			
22. SUMMARY OF THE INVENTION			
23. SUMMARY OF THE INVENTION			
24. SUMMARY OF THE INVENTION			
25. SUMMARY OF THE INVENTION			
26. SUMMARY OF THE INVENTION			
27. SUMMARY OF THE INVENTION			
28. SUMMARY OF THE INVENTION			
29. SUMMARY OF THE INVENTION			
30. SUMMARY OF THE INVENTION			
31. SUMMARY OF THE INVENTION			
32. SUMMARY OF THE INVENTION			
33. SUMMARY OF THE INVENTION			
34. SUMMARY OF THE INVENTION			
35. SUMMARY OF THE INVENTION			
36. SUMMARY OF THE INVENTION			
37. SUMMARY OF THE INVENTION			
38. SUMMARY OF THE INVENTION			
39. SUMMARY OF THE INVENTION			
40. SUMMARY OF THE INVENTION			
41. SUMMARY OF THE INVENTION			
42. SUMMARY OF THE INVENTION			
43. SUMMARY OF THE INVENTION			
44. SUMMARY OF THE INVENTION			
45. SUMMARY OF THE INVENTION			
46. SUMMARY OF THE INVENTION			
47. SUMMARY OF THE INVENTION			
48. SUMMARY OF THE INVENTION			
49. SUMMARY OF THE INVENTION			
50. SUMMARY OF THE INVENTION			
51. SUMMARY OF THE INVENTION			
52. SUMMARY OF THE INVENTION			
53. SUMMARY OF THE INVENTION			
54. SUMMARY OF THE INVENTION			
55. SUMMARY OF THE INVENTION			
56. SUMMARY OF THE INVENTION			
57. SUMMARY OF THE INVENTION			
58. SUMMARY OF THE INVENTION			
59. SUMMARY OF THE INVENTION			
60. SUMMARY OF THE INVENTION			
61. SUMMARY OF THE INVENTION			
62. SUMMARY OF THE INVENTION			
63. SUMMARY OF THE INVENTION			
64. SUMMARY OF THE INVENTION			
65. SUMMARY OF THE INVENTION			
66. SUMMARY OF THE INVENTION			
67. SUMMARY OF THE INVENTION			
68. SUMMARY OF THE INVENTION			
69. SUMMARY OF THE INVENTION			
70. SUMMARY OF THE INVENTION			
71. SUMMARY OF THE INVENTION			
72. SUMMARY OF THE INVENTION			
73. SUMMARY OF THE INVENTION			
74. SUMMARY OF THE INVENTION			
75. SUMMARY OF THE INVENTION			
76. SUMMARY OF THE INVENTION			
77. SUMMARY OF THE INVENTION			
78. SUMMARY OF THE INVENTION			
79. SUMMARY OF THE INVENTION			
80. SUMMARY OF THE INVENTION			
81. SUMMARY OF THE INVENTION			
82. SUMMARY OF THE INVENTION			
83. SUMMARY OF THE INVENTION			
84. SUMMARY OF THE INVENTION			
85. SUMMARY OF THE INVENTION			
86. SUMMARY OF THE INVENTION			
87. SUMMARY OF THE INVENTION			
88. SUMMARY OF THE INVENTION			
89. SUMMARY OF THE INVENTION			
90. SUMMARY OF THE INVENTION			
91. SUMMARY OF THE INVENTION			
92. SUMMARY OF THE INVENTION			
93. SUMMARY OF THE INVENTION			
94. SUMMARY OF THE INVENTION			
95. SUMMARY OF THE INVENTION			
96. SUMMARY OF THE INVENTION			
97. SUMMARY OF THE INVENTION			
98. SUMMARY OF THE INVENTION			
99. SUMMARY OF THE INVENTION			
100. SUMMARY OF THE INVENTION			

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Classification No.	
Inventor or Inventors' Name (Classification IPC) or Invention Classification No. (IPC)		A61K37/02	
Int. Cl. 5 C12N15/19;		C07K13/00;	
2. FIELD OF SEARCH			
Inventor's Classification No.		Classification No.	
Int. Cl. 5		C07K : C12N : A61K	
3. DISCLOSURE SUMMARY			
4. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
5. CLAIMS			
6. ABSTRACT			
7. CITATIONS			
8. OTHER INFORMATION			
9. SUMMARY OF THE INVENTION			
10. SUMMARY OF THE INVENTION			
11. SUMMARY OF THE INVENTION			
12. SUMMARY OF THE INVENTION			
13. SUMMARY OF THE INVENTION			
14. SUMMARY OF THE INVENTION			
15. SUMMARY OF THE INVENTION			
16. SUMMARY OF THE INVENTION			
17. SUMMARY OF THE INVENTION			
18. SUMMARY OF THE INVENTION			
19. SUMMARY OF THE INVENTION			
20. SUMMARY OF THE INVENTION			
21. SUMMARY OF THE INVENTION			
22. SUMMARY OF THE INVENTION			
23. SUMMARY OF THE INVENTION			
24. SUMMARY OF THE INVENTION			
25. SUMMARY OF THE INVENTION			
26. SUMMARY OF THE INVENTION			
27. SUMMARY OF THE INVENTION			
28. SUMMARY OF THE INVENTION			
29. SUMMARY OF THE INVENTION			
30. SUMMARY OF THE INVENTION			
31. SUMMARY OF THE INVENTION			
32. SUMMARY OF THE INVENTION			
33. SUMMARY OF THE INVENTION			
34. SUMMARY OF THE INVENTION			
35. SUMMARY OF THE INVENTION			
36. SUMMARY OF THE INVENTION			
37. SUMMARY OF THE INVENTION			
38. SUMMARY OF THE INVENTION			
39. SUMMARY OF THE INVENTION			
40. SUMMARY OF THE INVENTION			
41. SUMMARY OF THE INVENTION			
42. SUMMARY OF THE INVENTION			
43. SUMMARY OF THE INVENTION			
44. SUMMARY OF THE INVENTION			
45. SUMMARY OF THE INVENTION			
46. SUMMARY OF THE INVENTION			
47. SUMMARY OF THE INVENTION			
48. SUMMARY OF THE INVENTION			
49. SUMMARY OF THE INVENTION			
50. SUMMARY OF THE INVENTION			
51. SUMMARY OF THE INVENTION			
52. SUMMARY OF THE INVENTION			
53. SUMMARY OF THE INVENTION			
54. SUMMARY OF THE INVENTION			
55. SUMMARY OF THE INVENTION			
56. SUMMARY OF THE INVENTION			
57. SUMMARY OF THE INVENTION			
58. SUMMARY OF THE INVENTION			
59. SUMMARY OF THE INVENTION			
60. SUMMARY OF THE INVENTION			
61. SUMMARY OF THE INVENTION			
62. SUMMARY OF THE INVENTION			
63. SUMMARY OF THE INVENTION			
64. SUMMARY OF THE INVENTION			
65. SUMMARY OF THE INVENTION			
66. SUMMARY OF THE INVENTION			
67. SUMMARY OF THE INVENTION			
68. SUMMARY OF THE INVENTION			
69. SUMMARY OF THE INVENTION			
70. SUMMARY OF THE INVENTION			
71. SUMMARY OF THE INVENTION			
72. SUMMARY OF THE INVENTION			
73. SUMMARY OF THE INVENTION			
74. SUMMARY OF THE INVENTION			
75. SUMMARY OF THE INVENTION			
76. SUMMARY OF THE INVENTION			
77. SUMMARY OF THE INVENTION			
78. SUMMARY OF THE INVENTION			
79. SUMMARY OF THE INVENTION			
80. SUMMARY OF THE INVENTION			
81. SUMMARY OF THE INVENTION			
82. SUMMARY OF THE INVENTION			
83. SUMMARY OF THE INVENTION			
84. SUMMARY OF THE INVENTION			
85. SUMMARY OF THE INVENTION			
86. SUMMARY OF THE INVENTION			
87. SUMMARY OF THE INVENTION			
88. SUMMARY OF THE INVENTION			
89. SUMMARY OF THE INVENTION			
90. SUMMARY OF THE INVENTION			
91. SUMMARY OF THE INVENTION			
92. SUMMARY OF THE INVENTION			
93. SUMMARY OF THE INVENTION			
94. SUMMARY OF THE INVENTION			
95. SUMMARY OF THE INVENTION			
96. SUMMARY OF THE INVENTION			
97. SUMMARY OF THE INVENTION			
98. SUMMARY OF THE INVENTION			
99. SUMMARY OF THE INVENTION			
100. SUMMARY OF THE INVENTION			

BEST AVAILABLE COPY

